



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Nachweis von Erdnuss- und Sesamallergenen mittels PCR und Real-time PCR

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Kristina Elisabeth Rilling
Studienrichtung: (lt. Studienblatt)	A 474 Diplomstudium Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. DI Dr. Helmut Mayer Universität für Bodenkultur Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie Abteilung Lebensmittelchemie

Wien, im November 2010

*Professoren, Kollegen, Freunde,
die mich in meiner Studienzeit begleiteten*

Euch allen gebührt mein Dank

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Lebensmittelallergie.....	3
2.1.1. Definitionen.....	3
2.1.2. Prävalenz und Epidemiologie	4
2.1.3. Pathogenese.....	5
2.1.4. Diagnose und Management	9
2.1.5. Kennzeichnung und Schwellenwerte.....	9
2.2. Lebensmittelallergene.....	10
2.2.1. Klassifikation	10
2.2.2. Beispiele für Proteinfamilien mit allergenem Charakter	11
2.2.2.1. Proteine des pflanzlichen Abwehrsystems	12
2.2.2.2. Cupin-Superfamilie	14
2.2.2.3. Prolamin-Superfamilie	15
2.2.2.4. Profiline	16
2.2.2.5. Lebensmittelallergene tierischen Ursprungs	17
2.2.3. Erdnuss-Allergene	18
2.2.4. Sesam-Allergene.....	21
2.3. Nachweismethoden für Lebensmittelallergene	22
2.3.1. Immunchemische Methoden	23
2.3.1.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	23
2.3.1.2. State of the Art	24
2.3.2. Molekularbiologische Verfahren	25
2.3.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
2.3.2.2. Real-time PCR	29
2.3.2.3. State of the Art	36

3. MATERIAL UND METHODEN.....	39
3.1. Probenmaterial.....	39
3.2. DNA-Isolierung.....	39
3.2.1. Prinzip.....	39
3.2.2. Geräte und Hilfsmittel	40
3.2.3. Reagenzien und Lösungen	40
3.2.4. Durchführung	40
3.3. DNA-Konzentrationsbestimmung	42
3.3.1. Prinzip.....	42
3.3.2. Geräte und Hilfsmittel	42
3.3.3. Reagenzien und Lösungen	42
3.3.4. Durchführung	43
3.3.5. Berechnung	43
3.4. Speziesspezifische PCR	44
3.4.1. Prinzip.....	44
3.4.2. Geräte und Hilfsmittel	44
3.4.3. Reagenzien und Lösungen	44
3.4.4. Durchführung	45
3.5. Agarosegelelektrophorese.....	47
3.5.1. Prinzip.....	47
3.5.2. Geräte und Hilfsmittel	47
3.5.3. Reagenzien und Lösungen	48
3.5.4. Durchführung	49
3.6. Färben, Entfärben und Fotografieren der Gele	50
3.6.1. Prinzip.....	50
3.6.2. Geräte und Hilfsmittel	51
3.6.3. Reagenzien und Lösungen	51
3.6.4. Durchführung	51
3.7. Real-time PCR	52
3.7.1. Prinzip.....	52
3.7.2. Geräte und Hilfsmittel	52
3.7.3. Reagenzien und Lösungen	53
3.7.4. Durchführung	53
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	57
4.1. DNA-Konzentrationsbestimmung	57
4.1.1. Aus Erdnuss isolierte DNA	57

4.1.2.	Aus Sesam isolierte DNA	57
4.2.	Speziesspezifische PCR – Gelelektrophorese	58
4.2.1.	Nachweis des Erdnuss-Allergens Ara h 3	58
4.2.2.	Nachweis des Sesam-Allergens Ses i 1.....	60
4.2.2.1.	Primerpaar SesamPr1F/SesamPr1R.....	60
4.2.2.2.	Primerpaar SesamPr2F/SesamPr2R.....	62
4.2.2.3.	Primerpaar SesF/SesR.....	65
4.3.	Real-time PCR	67
4.3.1.	Nachweis des Erdnuss-Allergens Ara h 3	67
4.3.2.	Nachweis des Sesam-Allergens Ses i 1.....	82
4.3.2.1.	Primerpaar SesamPr1F/SesamPr1R.....	82
4.3.2.2.	Primerpaar SesamPr2F/SesamPr2R.....	87
4.3.2.3.	Primerpaar SesF/SesR.....	89
5.	SCHLUSSBETRACHTUNG	91
6.	ZUSAMMENFASSUNG	93
7.	ABSTRACT	95
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	97

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2. 1. Einteilung der Unverträglichkeitsreaktionen auf Lebensmittel [BUCHANAN et al., 2006].....	3
Abb. 2. 2. Überblick über die 4 Typen von Hypersensibilitätsreaktionen [JANEWAY et al., 2001] 7	
Abb. 2. 3. Zwei Phasen einer allergischen Reaktion [BUCHANAN et al., 2006].....	8
Abb. 2. 4. Überblick über die häufigsten Symptome einer Lebensmittelallergie [BUCHANAN et al., 2006].....	8
Abb. 2. 5. Schema für ein zwei- bzw. dreistufiges Temperatur/Zeitprotokoll [LOTTSPREICH und ENGELS, 2006].....	29
Abb. 2. 6. Schematische Darstellung einer Amplifikationskurve [BIORAD, 2006]	34
Abb. 2. 7. Beispiel für eine Standardkurve	35
Abb. 4. 1. Erdnuss-spezifische PCR mit Primer Arah3AF/Arah3ABR (50°C-66°C)	58
Abb. 4. 2. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr1F/SesamPr1R (54°C)	60
Abb. 4. 3. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr1F/SesamPr1R (56°C)	60
Abb. 4. 5. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr1F/SesamPr1R (50°C)	61
Abb. 4. 4. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr1F/SesamPr1R (52°C)	61
Abb. 4. 6. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr1F/SesamPr1R (50°C-66°C).....	61
Abb. 4. 7. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr2F/SesamPr2R (58°C)	63
Abb. 4. 8. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr2F/SesamPr2R (56°C)	63
Abb. 4. 9. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr2F/SesamPr2R (52°C)	63
Abb. 4. 10. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr2F/SesamPr2R (54°C)	63
Abb. 4. 11. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr2F/ SesamPr2R (60°C-66°C)	64
Abb. 4. 12. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesF/SesR (50°C-70°C).....	65
Abb. 4. 13. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesF/SesR (63°C)	66
Abb. 4. 14. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesF/SesR (64°C)	66
Abb. 4. 15. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesF/SesR (60°C-70°C).....	66
Abb. 4. 16. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesF/SesR (65°C)	66
Abb. 4. 17. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 61°C mit 3stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	68
Abb. 4. 18. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C mit 3stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	68
Abb. 4. 19. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C mit 3stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	69
Abb. 4. 20. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 65°C mit 3stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	69
Abb. 4. 21. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 67°C mit 3stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	69
Abb. 4. 22. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 61°C; 3stufig).....	70
Abb. 4. 23. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 63°C; 3stufig).....	70
Abb. 4. 24. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 64°C; 3stufig).....	70

Abb. 4. 25. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 65°C; 3stufig)	71
Abb. 4. 26. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 67°C; 3stufig)	71
Abb. 4. 27. Vergleich der Standardgeraden der Temperaturversuche von Arah3AF/Arah3ABR bei 61°C bis 67°C	72
Abb. 4. 28. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C 20s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	74
Abb. 4. 29. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C 30s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	74
Abb. 4. 30. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C 40s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	74
Abb. 4. 31. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	75
Abb. 4. 32. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C 80s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	75
Abb. 4. 33. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C 40s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	76
Abb. 4. 34. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5	76
Abb. 4. 35. Vergleich der Standardgeraden von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C bei 40s und 60s	77
Abb. 4. 36. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 63°C-60s; 2stufig)	78
Abb. 4. 37. Amplifikationskurven von Abb. 4. 38. Amplifikationskurven von	78
Abb. 4. 39. Vergleich der Standardgeraden von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C dreistufig und 63°C-60s zweistufig	79
Abb. 4. 40. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5 – Reaktionsgefäße mit gewölbten Deckeln	80
Abb. 4. 41. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5 – Reaktionsgefäße mit flachen Deckeln	80
Abb. 4. 42. Vergleich der Standardgeraden von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C-60s mit unterschiedlichen Reaktionsgefäßen	81
Abb. 4. 43. Amplifikationskurven von SesamPr1F/SesamPr1R bei 65°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96-high profile	83
Abb. 4. 44. Schmelzkurvenanalyse von SesamPr1F/SesamPr1R (AT 65°C-60s; 2stufig)	83
Abb. 4. 45. Amplifikationskurven von SesamPr1F/SesamPr1R bei 65°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96-low profile	84
Abb. 4. 46. Schmelzkurvenanalyse von SesamPr1F/SesamPr1R (AT 65°C-60s; 2stufig)	84
Abb. 4. 47. Amplifikationskurven von SesamPr1F/SesamPr1R bei 65°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96-low profile	85
Abb. 4. 48. Schmelzkurvenanalyse von SesamPr1F/SesamPr1R (AT 65°C-60s; 2stufig)	85
Abb. 4. 49. Amplifikationskurven von SesamPr1F/SesamPr1R bei 67°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96-low profile	86
Abb. 4. 50. Schmelzkurvenanalyse von SesamPr1F/SesamPr1R (AT 67°C-60s; 2stufig)	86

Abb. 4. 51. Amplifikationskurven von SesamPr2F/SesamPr2R bei 62°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96	87
Abb. 4. 52. Schmelzkurvenanalyse von SesamPr2F/SesamPr2R (AT 62°C-60s; 2stufig).....	88
Abb. 4. 53. Vergleich der Standardgeraden von SesamPr2F/SesamPr2R bei 62°C bis 66°C.....	89
Abb. 4. 54. Amplifikationskurven von SesF/SesR bei 68°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96	90
Abb. 4. 55. Schmelzkurvenanalyse von SesF/SesR (AT 68°C-60s; 2stufig).....	90

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2. 1. Überblick über veröffentlichte LOAEL-Werte für Lebensmittelallergene [modifiziert nach BUCHANAN et al., 2006].....	10
Tab. 3. 1. Übersicht über die für die Analysen verfügbaren Proben	39
Tab. 3. 2. Geräte und Hilfsmittel für die DNA-Isolierung	40
Tab. 3. 3. Reagenzien und Lösungen für die DNA-Isolierung	40
Tab. 3. 4. Geräte und Hilfsmittel für die Bestimmung der DNA-Konzentration	42
Tab. 3. 5. Reagenzien und Lösungen für die Bestimmung der DNA-Konzentration	42
Tab. 3. 6. Geräte und Hilfsmittel für die Durchführung einer PCR	44
Tab. 3. 7. Reagenzien und Lösungen für die Durchführung einer PCR	44
Tab. 3. 8. Übersicht über die verwendeten Primerpaare	45
Tab. 3. 9. Pipettierschema für einen PCR-Ansatz.....	46
Tab. 3. 10. Temperaturprogramm für die speziesspezifische PCR	46
Tab. 3. 11. Geräte und Hilfsmittel für die Durchführung einer Agarosegelelektrophorese.....	47
Tab. 3. 12. Reagenzien und Lösungen für die Durchführung einer Agarosegelelektrophorese...	48
Tab. 3. 13. Geräte und Hilfsmittel zum Färben und Fotografieren der Gele	51
Tab. 3. 14. Reagenzien und Lösungen zum Färben und Fotografieren der Gele	51
Tab. 3. 15. Geräte und Hilfsmittel für die Durchführung einer Real-time PCR	52
Tab. 3. 16. Reagenzien und Lösungen für die Durchführung einer Real-time PCR.....	53
Tab. 3. 18. Pipettierschema für die Standardreihe	53
Tab. 3. 19. Pipettierschema für einen Real-time PCR-Ansatz	54
Tab. 3. 20. Dreistufiges Temperatur/Zeitprogramm	55
Tab. 3. 21. Zweistufiges Temperatur/Zeitprogramm	55
Tab. 4. 1. Ergebnisse der DNA-Konzentrationsbestimmung von Erdnuss	57
Tab. 4. 2. Ergebnisse der DNA-Konzentrationsbestimmung von Sesam	57
Tab. 4. 3. Vergleich der mittleren C_t -Werte der Temperaturversuche von Arah3AF/Arah3ABR bei 61°C bis 67°C.....	72
Tab. 4. 4. Vergleich von Steigung, Effizienz und R^2 der Temperaturversuche von Arah3AF/Arah3ABR bei 61°C bis 67°C.....	73
Tab. 4. 5. Vergleich der mittleren C_t -Werte von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C bei 40s und 60s...	77
Tab. 4. 6. Vergleich von Steigung, Effizienz und R^2 von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C bei 40s und 60s	77

Tab. 4. 7. Vergleich der mittleren C_t -Werte von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C dreistufig und 63°C-60s zweistufig	79
Tab. 4. 8. Vergleich von Steigung, Effizienz und R^2 von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C dreistufig und 63°C-60s zweistufig	79
Tab. 4. 9. Vergleich der mittleren C_t -Werte von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C-60s mit unterschiedlichen Reaktionsgefäßen.....	81
Tab. 4. 10. Vergleich von Steigung, Effizienz und R^2 der Materialversuche von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C-60s.....	81
Tab. 4. 11. Vergleich der mittleren C_t -Werte von SesamPr2F/SesamPr2R bei 62°C bis 66°C	88
Tab. 4. 12. Vergleich von Steigung, Effizienz und R^2 von SesamPr2F/SesamPr2R bei 62°C bis 66°C	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AT	Annealingtemperatur
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ct	Threshold Cycle
DBPCFC	Double-Blind, Placebo-Controlled Food Challenge
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EAST	Enzyme Allergosorbent Test
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
G	Guanin
ICP-MS	Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie
IgE	Immunglobulin E
kDa	Kilo-Dalton
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
LTP	Lipidtransfer Protein
NTC	No Template Control
OAS	Orales Allergiesyndrom
PCR	Polymerasekettenreaktion
ppm	parts per million
PR	Pathogenesis-related Protein,
RAST	Radio-Allergosorbent Test
RIE	Rocket Immuno-Electrophoresis
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SPT	Skin prick test
T	Thymin
UHQ	Ultra High Quality

1. Einleitung und Fragestellung

Lebensmittelallergien treten hauptsächlich in industrialisierten Ländern auf. Im Gegensatz zu anderen Unverträglichkeitsreaktionen, wie Intoleranzen oder toxischen Reaktionen, werden Lebensmittelallergien durch immunologische Mechanismen ausgelöst, wobei die Mehrheit der immunologischen Reaktionen durch IgE vermittelt wird [SAMPSON, 2004].

Obwohl Lebensmittel aus zahlreichen, unterschiedlichen Proteinen aufgebaut sind, verfügen nur ein paar einzelne Proteinfamilien über allergenes Potential. Bei den meisten Lebensmittelallergenen handelt es sich um Glykoproteine, die eine gewisse Resistenz gegen Hitzeeinwirkung und Verdauungsenzyme zeigen [SICHERER und SAMPSON, 2006]. Bisher konnten 11 verschiedene Erdnuss-Allergene (*Ara h 1-11*) und 7 Sesam-Allergene (*Ses i 1-7*) identifiziert werden. Allergische Reaktionen auf Erdnuss und Sesam sind oft schwer und enden nicht selten in lebensbedrohlichen anaphylaktischen Reaktionen [COHEN et al., 2007; WEN et al., 2007]. Aus diesem Grund ist es unerlässlich, Allergene effizient in Lebensmittel nachweisen und auch quantifizieren zu können, um dem Verbraucher entsprechende Sicherheit zu gewährleisten.

Detektion und Quantifizierung von Lebensmittelallergenen sind nicht immer einfach, da viele Faktoren den Nachweis beeinflussen können, und Daten über notwendige Sensibilitäten der Nachweismethoden unvollständig sind [BUCHANAN et al., 2006]. In der Lebensmittelanalytik werden überwiegend ELISA-Techniken für den Allergennachweis eingesetzt [POMS et al., 2004], wobei der Stellenwert von auf PCR-basierenden Verfahren deutlich zunimmt, da sich diese Analysemethoden durch geringe Nachweisgrenzen und hohe Spezifität auszeichnen [MATISSEK et al., 2010].

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten das Erdnuss-Allergen *Ara h 3* und das Sesam-Allergen *Ses i 1* mittels PCR-Gelelektrophorese und mit Real-time PCR nachgewiesen werden. Ziel der Arbeit war es, Spezifität und Sensibilität der eingesetzten Primerpaare zu überprüfen, sowie die Reaktionsbedingungen für die Real-time PCR zu optimieren.

2. Literaturübersicht

2.1. Lebensmittelallergie

Lebensmittelallergien stellen vor allem in den industrialisierten Ländern ein Gesundheitsproblem dar, und die Tendenz zu Hypersensitivitätsreaktionen ist stark zunehmend [SAMPSON, 2004].

2.1.1. Definitionen

Die Thematik der Lebensmittelallergie umfasst einige unterschiedliche Begriffe, die zu differenzieren für das Verständnis wesentlich sind, und vorweg kurz erläutert werden sollen.

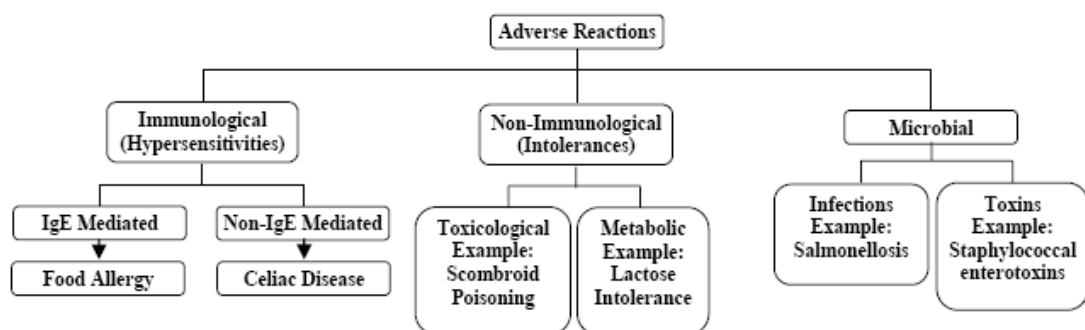


Abb. 2. 1. Einteilung der Unverträglichkeitsreaktionen auf Lebensmittel [BUCHANAN et al., 2006]

Lebensmittelunverträglichkeit wird in vielen wissenschaftlichen Publikationen als Oberbegriff, der alle anormalen Reaktionen des Körpers auf die Aufnahme von Lebensmitteln miteinschließt, verwendet.

Eine Überempfindlichkeitsreaktionen auf Lebensmittel wird durch einen definierten Reiz in einer für die Bevölkerungsmehrheit tolerablen Konzentration ausgelöst, wobei zwischen immunologischer Lebensmittelhypersensitivität (Lebensmittelallergie) und nicht-immunologischer Lebensmittelhypersensitivität (Lebensmittelintoleranz) differenziert wird.

Eine Lebensmittelallergie wird als eine immunologische Reaktion auf die Aufnahme eines Lebensmittels definiert. Die immunologische Reaktion kann IgE-vermittelt oder nicht-IgE-vermittelt ablaufen.

Eine Lebensmittelintoleranz stellt eine anormale physiologische Reaktion auf ein Lebensmittel dar. Die Auslöser sind diversen Ursprungs, wobei aber das Immunsystem nicht aktiviert wird [BURKS und BALLMER-WEBER, 2006; JOHANSSON et al., 2001; SAMPSON, 2004].

2.1.2. Prävalenz und Epidemiologie

In Mitteleuropa sind 2 bis 3% der Erwachsenen gegenüber Lebensmittel allergisch und 4% der Kleinkinder weisen eine Lebensmittelallergie auf.

Bei Kindern sind hauptsächlich Kuhmilch, Eier, Erdnuss, Weizen, Soja, Schalennüsse, Fisch und Krustentiere für Lebensmittelallergien verantwortlich [SICHERER und SAMPSON, 2006]. Am häufigsten treten Lebensmittelallergien in den ersten ein bis zwei Lebensjahren auf und werden von rund 80% der Kinder bis zum Schuleintritt überwunden, wozu Kuhmilch-, Eier-, Soja- und Weizenallergien zählen [WOOD, 2003].

Obwohl Allergien gegen Erdnüsse, Schalennüsse und Meeresfrüchte als lebenslang beständig erachtet werden, zeigen neuere Studien, dass durchaus die Möglichkeit besteht, eine Toleranz gegenüber Erdnüssen zu entwickeln, wobei die Auswachsrate im Vergleich zu Ei- und Milchallergien relativ gering ist. In diesen Fällen spielt die Schwere der Allergie eine Rolle, denn Personen mit milden allergischen Reaktionen haben wesentlich bessere Chancen, aus ihrer Allergie herauszuwachsen. Umgekehrt kann es ebenfalls wieder zu Rückfällen kommen, was aber in der Regel ungewöhnlich ist [FLEISCHER et al., 2003].

Sesamallergien ähneln hinsichtlich dem Zeitpunkt einer Allergiediagnose und dem Schema der Entwicklung einer Toleranz denen der Erdnussallergie. Rund 80% der auf Sesam allergischen Kinder wird lebenslang damit konfrontiert sein [COHEN et al., 2007]. Es ist nicht ungewöhnlich, dass sesamallergische Kinder gegen mehrere

Allergene sensibilisiert sind. Dazu zählen vor allem Schalennüsse, Erdnüsse und andere Samen wie Senf und Mohn. Diesen Kreuzreaktivitäten zwischen diversen Allergenen wird große Bedeutung zugeschrieben, aber man ist noch weit davon entfernt, die gesamten klinischen Auswirkungen zu verstehen [SICHERER, 2001].

Bei Erwachsenen treten Erdnuss-, Schalennuss-, Fisch- und Krustentierallergien am häufigsten auf. Eine Erklärung hierfür liegt in der Beständigkeit dieser Allergien, denn die meisten von diesen Allergien werden bereits im Kindesalter erworben und bleiben lebenslang bestehen [WOOD, 2003].

Die Epidemiologie von Lebensmittelallergien wird durch kulturelle und geografische Ernährungsgewohnheiten beeinflusst [SICHERER und TEUBER, 2004]. Beispielsweise ist Sesam ein Hauptallergen in Ländern mit starkem Sesamkonsum, während in den USA und Europa die Problematik weit geringer ist. In Ländern wie Israel, wo Sesam ein wichtiger Bestandteil in der Ernährung Kleinkinder ist, treten Sesamallergien gewöhnlich in den ersten Lebensjahren auf, im Gegensatz zu Berichten von Europa und den USA, wo Sesamallergien erst später im Leben ausbrechen [COHEN et al., 2007; DERBY et al., 2005]. Auch ist eine Lebensmittelallergie teilweise genetisch vorbestimmt, wobei atopische Krankheiten in der Familie oftmals einen Risikofaktor darstellen [SICHERER und TEUBER, 2004].

2.1.3. Pathogenese

Bei Lebensmittelallergien werden zwei Arten von Allergenen – Klasse I und Klasse II – unterschieden.

Lebensmittelallergien der Klasse I sind das Ergebnis einer Sensibilisierung gegen Lebensmittelallergene über den Magen-Darm-Trakt. Eine wichtige Eigenschaft dieser allergenen Proteine ist ihre Stabilität gegenüber Verdauungsenzymen. Auch ist diese Art von Lebensmittelallergie kaum bei Erwachsenen zu finden, da sie eine typische Manifestation des atopischen Syndroms darstellt und folglich größtenteils Kleinkinder betrifft [SICHERER und SAMPSON, 2006; BREITENEDER und EBNER, 2000].

Bei Lebensmittelallergien der Klasse II erfolgt der Sensibilisierungsprozess über die Atemwege. Die dafür verantwortlichen Allergene sind meistens labile Proteine wie beispielsweise Pollen, die bei allergischen Individuen die Bildung von IgE bewirken. Dieses IgE erkennt wiederum homologe Epitope der Proteine pflanzlichen Ursprungs und kann auf diesem Weg eine Lebensmittelallergie auslösen [SICHERER und SAMPSON, 2006].

Wie Studien an Mäusen [HSIEH et al., 2003] und Ergebnisse von humanen epidemiologischen Studien [LACK, 2003] zeigen, können manche Allergene der Klasse I, wie Eier und Erdnüsse, die Barriere der immunologischen Toleranz umgehen und den Sensibilisierungsprozess über die Haut auslösen.

Der Gastrointestinaltrakt ist das größte immunologische Organ des menschlichen Körpers. Eine Störung in der komplexen physiologischen und immunologischen Struktur der gastrointestinalen Schleimhautbarriere fördert die Entwicklung von Lebensmittelallergien. Ergebnisse von Studien [UNTERSMAJR et al., 2005a], in denen Probanden im Zuge der Behandlung von Magengeschwüren mit Medikamenten, die den pH-Wert der Magensäure beeinflussen, therapiert wurden, weisen auf eine erhöhte Allergisierung hin. Des Weiteren verstärken unausgereifte Komponenten der Darmbarriere, wie zum Beispiel unzureichende Enzymaktivität, die Prävalenz einer Lebensmittelallergie bei Kleinkindern. Auch bei intakter Barriere werden rund 2% der aufgenommenen Lebensmittelallergene im Magen-Darm Trakt absorbiert und in immunologisch aktiver Form durch den Körper transportiert, wobei aber die immunologische Toleranz die Oberhand behält [CHEHADE und MAYER, 2005; SAMPSON, 2004].

Obwohl der menschliche Körper einer Vielzahl von Lebensmittelallergenen ausgesetzt ist, leidet nur ein Bruchteil der Bevölkerung an einer Lebensmittelallergie. Eine Erklärung hierfür liefert das Phänomen der immunologischen Toleranz. Die immunologische Toleranz bezeichnet den Zustand des Immunsystems, körpereigene Substanzen und Gewebe als solche zu erkennen, aber nicht zu bekämpfen. Es bleibt also eine spezifische Immunantwort auf eine Antigenstimulation aus. Ein

Zusammenbruch der Mechanismen der immunologischen Toleranz oder eine Störung bei ihrer Entwicklung haben Überempfindlichkeitsreaktion auf Lebensmittel zur Folge [CHEHADE und MAYER, 2005].

Aufgrund verschiedener immunologischer Mechanismen werden vier Typen von Hypersensibilitätsreaktionen unterschieden.

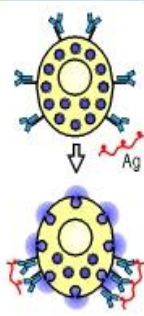
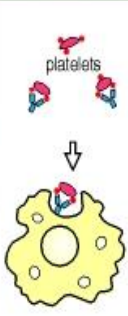
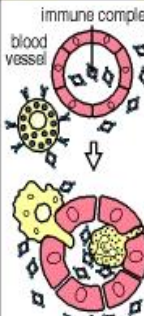
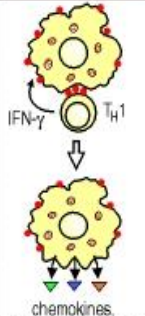
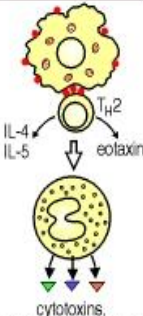
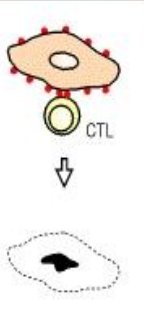
	Type I	Type II	Type III	Type IV		
Immune reactant	IgE	IgG	IgG	T _H 1 cells	T _H 2 cells	CTL
Antigen	Soluble antigen	Cell- or matrix-associated antigen	Soluble antigen	Soluble antigen	Soluble antigen	Cell-associated antigen
Effector mechanism	Mast-cell activation	FcR ⁺ cells (phagocytes, NK cells)	FcR ⁺ cells Complement	Macrophage activation	Eosinophil activation	Cytotoxicity
						
Example of hypersensitivity reaction	Allergic rhinitis, asthma, systemic anaphylaxis	Some drug allergies (e.g., penicillin)	Serum sickness, Arthus reaction	Contact dermatitis, tuberculin reaction	Chronic asthma, chronic allergic rhinitis	Contact dermatitis

Abb. 2. 2. Überblick über die 4 Typen von Hypersensibilitätsreaktionen [JANEWAY et al., 2001]

Die Typen I, II und III werden durch Antikörper vermittelt, wobei Reaktionen von Typ I auf IgE, das zur Aktivierung der Mastzellen führt, beruhen und für die Typen II und III IgG verantwortlich ist. IgG löst entweder über Fc-Rezeptoren vermittelte oder phagozytotische Effektormechanismen unterschiedlicher Stärke aus. Reaktionen vom Typ II richten sich gegen Zelloberflächen- und Matrixantigene und führen zu zellspezifischen Gewebeschäden. Typ-III-Reaktionen richten sich gegen lösliche Antigene und schädigen ebenfalls das Gewebe mittels von Immunkomplexen ausgelösten Reaktionen. T-Zellen vermitteln Typ-IV-Reaktionen.

Lebensmittelallergien sind überwiegend immunologische Reaktionen von Typ I.

Eine allergische Reaktion durchläuft in der Regel zwei Phasen. In der Sensibilisierungsphase, die in der Regel symptomfrei ist, führt der Erstkontakt mit einem bestimmten Allergen zu einer immunologischen Erstantwort. Bei einem erneuten Kontakt mit diesem Allergen kommt es zu einer zweiten Immunreaktion, die klinisch manifeste unerwünschte Wirkungen mit entsprechenden Krankheitserscheinungen hervorruft [BUCHANAN et al., 2006].

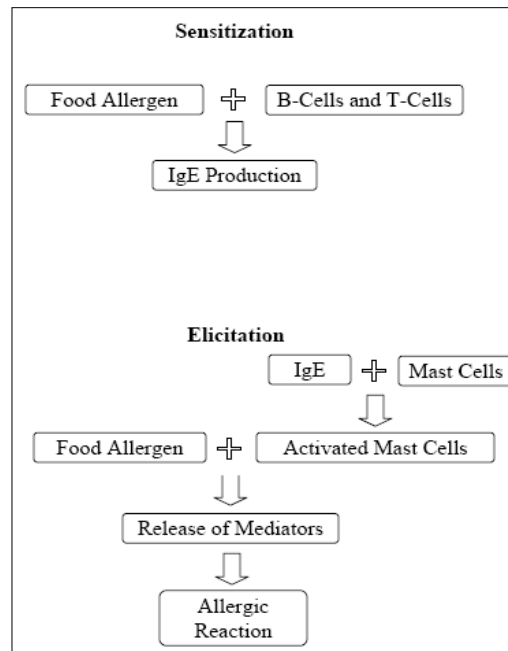


Abb. 2. 3. Zwei Phasen einer allergischen Reaktion [BUCHANAN et al., 2006]

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die am häufigsten auftretenden Symptome einer Lebensmittelallergie.

		Subjective Symptoms	Objective Signs
CUTANEOUS	Skin	Pruritus (Itching)	Skin flushing or erythema (redness) Piloerection ("goosebumps") Rash: Urticaria (hives) - acute Eczema (usually delayed, >6 hours) Angioedema (swelling, especially face)
	Oral cavity (lips, tongue, palate)	Pruritus (Itching), numbness, dryness	Edema (swelling, may also include the uvula)
	Eyes, conjunctiva	Pruritus (Itching)	Periorbital (around eyes) edema, redness of conjunctiva and tearing
GASTROINTESTINAL		Nausea, pain (except infants/young child)	Vomiting, diarrhea, abdominal pain (infants)
RESPIRATORY	Nose	Pruritus (Itching)	Nasal congestion or runniness, sneezing
	Larynx, throat	Pruritus (Itching), dryness/tightness	Swelling around the larynx and vocal cord, voice hoarseness, stridor (inspiratory wheeze), cough
	Lungs	Shortness of breath, chest pain/tightness	Respiratory distress (i.e., ↑ breathing rate, difficulty catching breath, ↓ peak expiratory flow measurement), cough, wheezing
HEART and CARDIOVASCULAR		Chest pain/ tightness, feeling of faintness, dizziness	Syncope (fainting, loss of consciousness), hypotension (low) or shock (very low blood pressure), dysrhythmia (abnormal heart rhythm)
OTHER		"Sense of impending doom"	Uterine contractions (women)

Abb. 2. 4. Überblick über die häufigsten Symptome einer Lebensmittelallergie [BUCHANAN et al., 2006]

Wie schwer eine allergische Reaktion ist, hängt von mehreren Faktoren ab, wie genetische Prädisposition, Alter, Typ des Allergens, Verarbeitungsgrad des Lebensmittels, Umwelteinflüsse und physiologische Konstitution [SAMPSON, 2003].

2.1.4. Diagnose und Management

Klinische Reaktionen und ein positiver Skin prick Test (SPT) oder der Nachweis von allergenspezifischem IgE im Serum reichen aus, um als Allergiker eingestuft zu werden, wobei der Grad der Sensitivität mit diesen Methoden nicht ermittelt werden kann. Für die Bestimmung der individuellen Empfindlichkeit auf ein Allergen ist die DBPCFC Methode (double-blind, placebo-controlled food challenge) der goldene Standard in der Diagnostik. Bei diesem Verfahren weiß weder der Untersuchte noch der Untersuchende welches Lebensmittel das Allergen enthält. Die Lebensmittel werden in unterschiedlichen Mengen verabreicht, und die klinischen Reaktionen ausgewertet [BUCHANAN et al., 2006]. Ein Problem in der Evaluierung von Lebensmittelallergien stellen neben unzuverlässigen Krankengeschichten und Grenzen der laboratorischen Nachweise falsch-positive SPT- und RAST-Ergebnisse dar, verursacht vor allem durch kreuzreaktive Proteine [SICHERER, 2001]. Mittels RAST-Verfahren (radio-allergosorbent) kann Allergen-spezifisches IgE in Patientenseren nachgewiesen werden und wird vor allem für die klinische Diagnose von Lebensmittelallergien eingesetzt [POMS et al., 2004].

Wurde eine Lebensmittelallergie diagnostiziert, ist die einzige effektive Therapie eine strikte Vermeidung dieses Allergens. Eliminationsdiäten können aber eventuell zu Mangelernährung und/oder Essstörungen führen, vor allem dann, wenn eine große Anzahl an Lebensmittel vermieden werden muss [SAMPSON, 1999].

2.1.5. Kennzeichnung und Schwellenwerte

Damit sensibilisierte Personen wissen, welche Lebensmittel sie meiden müssen, ist es für den Hersteller verpflichtend, Lebensmittelzutaten, die allergische Reaktionen auslösen können, entsprechend auf der Verpackung zu kennzeichnen. Dazu gehören folgenden Lebensmittel und daraus gewonnene Erzeugnisse: glutenhaltige Getreide,

Krebstiere, Eier, Fisch, Erdnüsse, Sojabohnen, Milch, Schalenfrüchte, Sellerie, Senf, Sesamsamen, Schwefeldioxid und Sulfite, Lupinen und Weichtiere. Mit den eindeutig zu kennzeichnenden Lebensmittelbestandteilen kommt der Konsument klar. Problematisch sind die sogenannten versteckten Allergene, die im Zuge des Herstellungsprozesses irrtümlich in das Lebensmittel gelangen [CREVEL et al., 2008; RICHTLINIE 2007/68/EG].

Viele Studien beschäftigen sich mit der Ermittlung einer Schwellenwertdosis für diverse Allergene, was kein einfaches Unterfangen darstellt, da viele Faktoren berücksichtigt werden müssen. Für folgende Allergene wurden LOAEL-Werte (lowest observed adverse effect level) veröffentlicht:

Lebensmittel	LOAEL (mg Protein)
Ei	0,13-1,0
Erdnuss	0,25-10
Milch	0,36-3,6
Schalennuss	0,02-7,5
Soja	88-522
Fisch	1-100

Tab. 2. 1. Überblick über veröffentlichte LOAEL-Werte für Lebensmittelallergene [modifiziert nach BUCHANAN et al., 2006]

Es ist schwierig absolute Schwellenwerte zu ermitteln, da die individuellen Sensibilisierungsgrade sehr unterschiedlich sind [TAYLOR et al., 2002].

2.2. Lebensmittelallergene

Die meisten Lebensmittelallergene sind wasserlösliche Glykoproteine mit einer Größe von 10 bis 70 kDa, die gegen Hitze, Säure und Proteasen relativ stabil sind. Obwohl in Lebensmitteln zahlreiche unterschiedliche Proteine zu finden sind, sind nur ein paar einzelne Proteinfamilien für die Mehrheit der immunologischen Reaktionen verantwortlich [SICHERER und SAMPSON, 2006].

2.2.1. Klassifikation

Seit der Identifizierung der ersten allergenen Proteine in den späten 1980ern, sind hunderte von Allergene identifiziert und ihre Sequenzen bestimmt worden. Um zu

verstehen, was ein Allergen ausmacht und wie es sich verhält, sind Informationen über evolutionäre und strukturelle Verwandtschaften zwischen den einzelnen Allergenen unerlässlich. Es existieren eine Reihe von Datenbanken, die Informationen über Allergene hinsichtlich molekularer, biochemischer und klinischer Eigenschaften sammeln, wie beispielsweise *Official List of Allergens* (<http://www.allergen.org>), *Allergome* (<http://www.allergome.org>), *Food Allergy Research and Resource Program Allergen Database* (<http://www.allergenonline.com>), *InFormAll* Datenbank (<http://foodallergens.ifr.ac.uk>) [RADAUER et al., 2008].

Eine Möglichkeit Allergene einzuteilen, stellt die Zuordnung zu bestimmten Allergengruppen oder zu bestimmte Proteinfamilien gemäß ihrer Aminosäuresequenz dar. Proteine werden zu Familien zusammengefasst, wenn sie signifikante Ähnlichkeiten in der Primärstruktur aufweisen und/oder sie sich in ihre Funktion und Struktur nachweisbar sehr ähneln. Gewöhnlich ist innerhalb einer Proteinfamilie eine enge evolutionäre Verwandtschaft gegeben. Zwei oder mehr Proteinfamilien, deren Mitglieder geringe Ähnlichkeiten der Primärsequenzen, aber gemeinsame funktionelle Eigenschaften und dasselbe Hauptstrukturmotiv aufweisen, werden in Superfamilien zusammengefasst [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

2.2.2. Beispiele für Proteinfamilien mit allergenem Charakter

Die meisten pflanzlichen Lebensmittelallergene gehören ein paar wenigen Proteinfamilien und Proteinsuperfamilien an. Die Cupin-Superfamilie, die Prolamin-Superfamilie und die *Bet v 1*-Familie beinhalten gemeinsam mit der Profilinfamilie mehr als 65 % der pflanzlichen Lebensmittelallergene. Eine ähnliche Verteilung kann für die Lebensmittelallergene tierischen Ursprungs, wo drei Proteinfamilien – Tropomyosine, Parvalbumine und Caseine – dominieren, festgehalten werden [HOFFMANN-SOMMERGRUBER und MILLS, 2009].

2.2.2.1. Proteine des pflanzlichen Abwehrsystems

Proteine des pflanzlichen Abwehrsystems, so genannte PRs (pathogenesis-related proteins), werden definiert als Proteine, die in einer Pflanze als Antwort auf eine Infektion durch Pathogene gebildet werden. Die PRs können in 14 Familien eingeteilt werden. Vergleicht man die Sequenzen der Aminosäuren aller bekannten pflanzlichen Lebensmittelallergene, so ist es auffallend, dass die Mehrheit dieser Allergene homolog zu den Proteinen der PR-Familien ist [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

- **Allergene homolog den PR-2 Typ Proteinen: β -1,3-Glucanasen**

Pflanzliche β -1,3-Glucanasen sind Monomere mit einer molekularen Masse von 25 bis 35 kDa. Die meisten Vertreter sind Endoglucanasen mit der Fähigkeit, die Zellwände von Pilzen durch Hydrolyse abzubauen. Ein Beispiel ist *Hev b 2*, ein wichtiges Latexallergen. Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen einer Latexallergie und einer Überempfindlichkeitsreaktion auf Lebensmittel, insbesondere auf Avocado, Banane, Kastanie, Feige und Kiwi. Homologe Proteine in diesen Früchten sind für die Kreuzreaktion verantwortlich [BREITENEDER und EBNER, 2000].

- **Allergene homolog den PR-3 Typ Proteinen: Klasse I Chitinasen**

Chitinasen kommen gewöhnlich als Monomere von 25 bis 35 kDa vor. Die meisten Vertreter sind Endochitinasen, die Chitin durch Hydrolyse abbauen können. Hevein in Latex weist eine hohe Sequenzähnlichkeit mit PR-3 und PR-4 Proteinen auf, wodurch sich die Kreuzreaktion mit den Chitinasen von Avocado, Banane und Kastanie erklären lässt [BREITENEDER und EBNER, 2000].

- **Allergene homolog den PR-5 Typ Proteinen: Thaumatin ähnliche Proteine**

Dieser Familie gehören Proteine mit verschiedenen Funktionen, unter anderem Pilzabwehr, an. Ihren Namen haben sie aufgrund der Homologie ihrer Sequenzen mit Thaumatin erhalten. Vertreter dieser Familie sind beispielsweise *Mal d 2* des Apfels, *Pru av 2* der Kirsche *Act c 2* der Kiwi [BREITENEDER und EBNER, 2000; BREITENEDER und RADAUER, 2004].

- **Allergene homolog den PR-10 Typ Proteinen: *Bet v 1* homologe Proteine**

Das häufigste klinische Syndrom, ausgelöst durch kreuzreaktives IgE, ist das orale Allergiesyndrom (OAS). Es besteht eine Assoziation zwischen Obst-, Gemüse-, Nussallergie und Pollenallergie. Die Ursache fast aller dieser Fälle ist die Kreuzreaktion von *Bet v 1*, dem Hauptallergen der Birke, mit den entsprechenden homologen Proteinen. Dem Allergen *Bet v 1* homolog sind *Mal d 1* des Apfels, *Pru av 1* der Kirsche, *Pru ar 1* der Aprikose, *Pyr c 1* des Pfirsichs und *Cor a 1* der Haselnuss [BREITENEDER und EBNER, 2000].

- **Allergene homolog den PR-14 Typ Proteinen: Lipidtransferproteine**

Unspezifische LTPs spielen eine wichtige Rolle bei der Pflanzenabwehr gegen Infektionen. Sie sind die Hauptallergene der Früchte der Rosengewächse [HOFFMANN-SOMMERGRUBER und MILLS, 2009]. Die 7 bis 9 kDa großen, monomeren Proteine akkumulieren gewöhnlich in den äußeren Schichten der Epidermis von Pflanzenorganen, wodurch sich die stärkere Allergenität der Schale verglichen mit dem Fruchtfleisch erklärt. Wichtige Eigenschaften dieser Familie sind ihre Resistenz gegen Proteolyse, drastische pH-Wert Änderungen oder thermischen Behandlungen [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

Unspezifische LTPs gelten als Hauptallergene von Pfirsich (*Pru p 3*), Apfel (*Mal d 3*) und Aprikose (*Pru ar 3*), wobei vor allem zwischen den Früchten der Prunoideae eine starke Kreuzreaktion, die auf den hohen Grad der Homologie ihrer N-terminalen Sequenzen zurückgeht, besteht. Dieses Phänomen ist nicht ungewöhnlich, da sie derselben Unterfamilie angehören. Interessant ist die Tatsache, dass Personen mit Pfirsichallergie starke allergische Reaktionen auf den botanisch nicht verwandten Mais (*Zea m 14*) zeigen, aber keine Reaktion auf anderes Getreide oder Gräserpollen. Folglich weist das Mais LTP eine gewisse Sequenzähnlichkeit mit den LTPs der Rosaceae auf, aber unter den diversen Getreidearten kommt keine Kreuzreaktion zwischen den 9 kDa Proteinen zustande [PASTORELLO et al., 2001a].

2.2.2.2. Cupin-Superfamilie

Die Cupine sind eine funktionell unterschiedliche Superfamilie von Proteinen. Sie beinhalten unter anderem die Globuline, die Proteinreservestoffe der Pflanzen, welche eine Hauptkomponente in der menschlichen Ernährung darstellen. Basierend auf ihrem Sedimentationskoeffizienten, können die Globuline in den 7S Vicilin-Typ und den 11S Legumin-Typ unterteilt werden [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

- **7S Globuline**

7S Globuline sind trimere Proteine von ungefähr 150 bis 190 kDa [SHEWRY et al., 1995]. Das am besten untersuchte allergene Vicilin ist das Hauptallergen der Erdnuss *Ara h 1*, das für Mehrheit aller fatalen Fälle von Anaphylaxie durch pflanzliche Proteine verantwortlich ist. Drei *Ara h 1-Monomere* formen einen sehr stabilen trimeren Komplex, der das Molekül vor Verdauung durch Proteasen und Denaturierung schützt [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

Bei der Sojabohne macht rund 50% der 7S Fraktion das β -Conglycinin, ein Glykoprotein, aus. Die β -Conglycinin-Trimere setzen sich aus drei Untereinheiten α , α' und β in verschiedenen Kombinationen zusammen, wobei die α Untereinheit *Gly m Bd 60K* eines der Hauptallergene der Sojabohne darstellt. Weitere Beispiele für allergene Proteine des Vicilintyps sind *Len c 1* in Linsen, *Jug r 2* in Walnüssen [TEUBER et al., 1999] und *Ses i 3* in Sesam [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

- **11S Globuline**

11S Globuline sind hexamere Proteine [SHEWRY et al., 1995]. Als Beispiel für diese Familie wird das Protein *Ara h 3* der Erdnuss angeführt. Die quartäre Struktur von *Ara h 3* gleicht in großem Maße der des Glycinins der Sojabohne. Sowohl die basische als auch die saure Kette jeder Untereinheit des Proteins kann IgE binden [KOPPELMAN et al., 2003].

Die 11S Fraktion der Sojaproteine besteht beinahe gänzlich aus Glycinin, dem dominierenden Speicherglobulin in Soja. Das Sojaglycinin setzt sich aus verschiedenen

Kombinationen der fünf Untereinheiten G1 bis G5 zusammen. Jede basische Kette der fünf Untereinheiten reagiert mit IgE [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

Weitere Beispiele sind *Bere 2* der Paranuss, *Fage 1* des Buchweizens [HOFFMANN-SOMMERGRUBER und MILLS, 2009], *Cor a 9* der Haselnuss und *Ana o 2* der Cashewnuss [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

2.2.2.3. Prolamin-Superfamilie

Alle Proteine dieser Superfamilie zeichnen sich durch ein niedriges Molekulargewicht aus, sind reich an Cystein und verfügen über ähnliche dreidimensionale Strukturen, die reich an α -Helices sind [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

- **2S Albumine**

Die 2S Albumine stellen die Hauptgruppe der Speicherproteine in vielen dikotylen Pflanzenarten dar. Typische 2S Albumine sind heterodimere Proteine, die aus zwei Polypeptidketten bestehen. Etliche Nuss- und Samenallergene sind 2S Albumine. Beispiele hierfür sind *Bere 1* der Paranuss, *Jug r 1* der Walnuss, 2S Albumine der Cashewnuss, *Sin a 1* der gelben Senfsamen und *Bra j 1* der orientalischen Senfsamen, *Ses i 2* der Sesamsamen und *Ara h 2, 6* und *7* der Erdnuss [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

- **Getreide Prolamine**

Die Getreideprolamine Gliadin und Glutenin in Weizen, Secalin in Roggen und Hordein in Gerste sind die wichtigsten Speicherproteine im Endosperm von Getreidekörnern [BREITENEDER und RADAUER, 2004]. Die höchste IgE-Reaktivität weist das niedermolekulargewichtige Glutenin, gefolgt von α -Gliadin und γ -Gliadin auf [MARUYAMA et al., 1998]. ω -5 Gliadin ist ein wichtiges Allergen bei Kindern mit Weizenallergie und es zeigt Kreuzreaktionen mit γ -70 und γ -35 Secalin und γ -3 Hordein [PALOSUO et al., 2001a und 2001b].

- **α -Amylase/Protease Inhibitoren in Getreide**

Enzyminhibitoren sind Komponenten des pflanzlichen Abwehrmechanismus. Sie schützen die Pflanze, indem sie die wichtigsten Verdauungsenzyme der Insekten, die Hydrolasen (α -Amylase und Proteinase), außer Kraft setzen [FRANCO et al., 2002]. Die allergenen Inhibitoren dieser Gruppe werden unter anderem von Weizen, Gerste, Roggen, Reis und Mais produziert. Sie sensibilisieren durch wiederholte Nahrungsaufnahme oder Inhalation anfällige Personen mit atopischen Krankheiten und lösen letztlich eine Allergie, Dermatitis oder Bäcker Asthma aus. Zu diesen Allergenen zählen die glycosilierten Untereinheiten des *CM16** Inhibitors von Weizen, die homologen Gerstenallergen *CMb** und *Hor v 15* und *Sec c 1* des Roggenmehls [BREITENEDER und RADAUER, 2004]. Der Weizen α -Amylase Inhibitor, ein 15 kDa Protein, ist ein wesentlicher Auslöser für Bäcker Asthma durch die Inhalation von Weizenmehl [JAMES et al., 1997]. Die dimeren α -Amylase Inhibitoren *RAI-1* und *RAI-3* von Reis sind die am besten charakterisierten Allergene dieser Gruppe [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

- **Unspezifische Lipidtransferproteine**

Die allergenen Vertreter dieser Gruppe sind bereits im Zusammenhang mit der PR-14 Familie diskutiert worden.

2.2.2.4. Profilin

Bei Profilinen handelt es sich um 12 bis 15 kDa große zytosolische Proteine, die in jeder eukaryotischen Zelle vorkommen und als Actin-bindende Proteine agieren. Höhere Pflanzen teilen sich 70% bis 85% ihrer Profilinsequenzen, wodurch sich häufige Kreuzreaktionen erklären lassen [HOFFMANN-SOMMERGRUBER und MILLS, 2009]. Eine Kreuzreaktion von Profilin-spezifischem IgE findet vor allem zwischen Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln statt. Profilin sind sehr empfindlich gegenüber Hitze und Verdauungsenzyme. Folglich tritt eine allergische Reaktion nach dem Konsum von rohen Lebensmitteln auf [JANKIEWICZ et al., 1997]. Beispiele für allergene Profilin finden sich in den mit Birkenpollen verwandten Früchten und Nüssen wie Birnen (*Pyr c*

4), Kirschen (*Pru av 4*), Pfirsichen (*Pru p 4*) und Haselnüssen (*Cor a 2*). Bei Patienten mit Allergien gegen Birken- und Gräserpollen können sie durchaus auch eine Allergie gegen Sellerie (*Api g 4*), Banane (*Mus xp 1*) und Melone (*Cuc m 2*) auslösen [BREITENEDER und RADAUER, 2004].

2.2.2.5. Lebensmittelallergene tierischen Ursprungs

Bei den tierischen Lebensmittelallergenen dominieren drei große Proteinfamilien, die Tropomyosine, die Parvalbumine und die Caseine. Es existieren natürlich noch weitere, aber nicht so weit verbreitete Allergenfamilien. Dazu gehören beispielsweise das β -Lactoglobulin *Bos d 5*, ein Milchallergen der Lipocalinfamilie und das α -Lactoglobulin *Bos d 4*, ein Milchallergen der C-Typ Lysozym/ α -Lactalbumin-Familie [HOFFMANN-SOMMERGRUBER und MILLS, 2009].

- **Tropomyosin**

Tropomyosine kommen in jeder eukaryotischen Zelle vor. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Muskelkontraktion. Sie erleichtern in der gestreiften Muskulatur die Interaktion zwischen dem Troponin und Aktin Komplex. Relevante Allergene finden sich hauptsächlich in Krustazeen und Weichtieren. Die Allergene dieser Gruppe weisen eine starke Kreuzreaktivität untereinander auf [HOFFMANN-SOMMERGRUBER und MILLS, 2009]. Bislang ist eine Allergenität nur von dem Tropomyosin der wirbellosen Tiere bekannt. Obwohl eine große Sequenzähnlichkeit zu dem Tropomyosin der Wirbeltiere besteht, ist dieses nicht allergen [RESTANI et al., 2002]. Auf Grund ihrer Struktur bleibt die Fähigkeit, IgE zu binden, auch nach Erhitzen und enzymatischer Verdauung bestehen. Als Beispiel für einen Vertreter dieser Gruppe ist *Pen a 1*, das Hauptallergen der Schrimps [ALBRECHT et al., 2008].

- **Parvalbumin**

Parvalbumine sind Ca^{2+} -bindende Proteine bei Wirbeltieren, die Ca^{2+} während der Muskelrelaxationsphase binden können. Parvalbumine stellen die Hauptallergene von Fischen dar, zeigen Kreuzreaktionen mit Parvalbuminen von Amphibien aber nicht mit

höheren Wirbeltieren [HOFFMANN-SOMMERGRUBER und MILLS, 2009]. Als Beispiel seien die Parvalbumine von Karpfen und Kabeljau angeführt. Sie weisen eine starke Ähnlichkeit in Sequenz und Struktur auf, wodurch die IgE-Kreuzreaktivität erklärbar ist [MA et al., 2008]. Des Weiteren sind diese Proteine sehr stabil gegenüber Hitze, aber instabil unter sauren Bedingungen, und ihre Allergenität wird durch ihren Abbau durch Enzyme des Verdauungstrakts stark reduziert. Allerdings könnten diese Allergene durch die Beeinflussung der physiologischen Verdauungsbedingungen erhalten bleiben und somit steigt das allergene Risiko wieder [UNTERSMAYR et al., 2005b].

- **Casein**

Caseine sind Proteine, die in der Milch von Säugetieren vorkommen. Die Caseinfraction beinhaltet vier verschiedene Proteine: α_{s1} -, α_{s2} -, β - und κ -Casein. α_{s1} -Casein und α_{s2} -Casein sind die wichtigsten Allergene der Milch, gefolgt von β -Casein. Es besteht die Möglichkeit einer IgE-Kreuzreaktion zwischen Kuhmilchcaseinen und Caseinen von Ziegen- und Schafmilch, wohingegen Caseine von Stutenmilch ein deutlich geringeres Risiko gegenüber Kreuzreaktivitäten aufweisen [BLANC et al., 2008; SPUERGIN et al., 1997].

2.2.3. Erdnuss-Allergene

Die Hauptallergene der Erdnuss, *Ara h 1-3*, zeichnen sich durch ihre stabile Natur aus und mehr als 95% der auf Erdnuss allergischen Personen weisen spezifisches IgE gegen diese Allergene auf [WEN et al., 2007]. Bisher sind 11 verschiedene Erdnuss-Allergene identifiziert und auf Basis ihrer biologischen Funktionen können sie alle mit Ausnahme von *Ara h 5* und *Ara h 8-11* als Speicherproteine klassifiziert werden. *Ara h 1-3* sind Speicherproteine vom Vicilin-, Conglutin- und Glycinin-Typ. *Ara h 3* und *Ara h 4* sind beinahe idente isoforme Proteine. *Ara h 6* und *Ara h 7* sind dem *Ara h 2* sehr ähnlich [LAUER et al., 2009]. *Ara h 5* gehört zur Familie der Profiline [BREITENEDER und EBNER, 2000] und *Ara h 8* ist homolog dem Birkenpollenallergen *Bet v 1* [MITTAG et al., 2004]. *Ara h 9* ist ein unspezifisches Lipidtransferprotein [LAUER et al., 2009] und *Ara h 10*

und 11 sind beides Oleosine, die als potentielle Allergene eingestuft werden, deren klinische Relevanz aber noch ungeklärt ist [PONS et al., 2002].

Ara h 1 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 63,5 kDa, das der Vicilin-Familie angehört [WEN et al., 2007]. Es formt sehr stabile Trimere, wobei die Monomere durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Betrachtet man die dreidimensionale Struktur von *Ara h 1*, so finden sich die hydrophoben Aminosäuren am distalen Ende, wo der Monomer-Monomer Kontakt stattfindet. Die Mehrheit der IgE bindenden Epitope sind ebenfalls in dieser Region lokalisiert und ausgehend von der sehr stabilen Natur dieses Allergens gegenüber enzymatischer Verdauung und Hitzeeinwirkung lässt sich vermuten, dass diese Struktur das IgE vor Degradation schützt. Das führt zu der Annahme, dass die quartäre Struktur eines Proteins eine signifikante Rolle hinsichtlich seiner Allergenität spielt [MALEKI et al., 2000a].

Ara h 2 ist ebenfalls ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa und weist eine Homologie zu der Conglutin-Familie auf [WEN et al., 2007]. *Ara h 2* agiert als ein schwacher Trypsin-Inhibitor, wobei Rösten die Aktivität um das 3,5 fache steigern kann. Zusätzlich zu seiner eigenen erhöhten Resistenz gegen Trypsinverdauung ist es interessant, dass *Ara h 2* *Ara h 1* vor einem Abbau durch Trypsin schützt. Für die stabile Struktur von *Ara h 2* sind maßgeblich Disulfidbindungen verantwortlich und der Verlust von Sulfhydrylgruppen als Folge der Maillardreaktion trägt vermutlich zu der erhöhten inhibitorischen Aktivität bei [MALEKI et al., 2003]. Als weitere Konsequenz der Maillardreaktion, verursacht durch das Rösten von Erdnüssen, können *Ara h 1* und *Ara h 2* um bis zu 90 mal mehr IgE binden als Allergene in rohen Erdnüssen und sie sind wesentlich resistenter gegen Hitze und Abbau durch Verdauungsenzyme. Dem zu Folge ist der Hitzebehandlung von Erdnüssen hinsichtlich der Steigerung von allergenen Eigenschaften eine wichtige Rolle zuzuschreiben [BEYER et al., 2001; MALEKI et al., 2000b; MONDOULET et al., 2005].

Ara h 3 hat ein Molekulargewicht von 14 bis 45 kDa. Die Aminosäuresequenz ist homolog mit denen der 11S Speicherproteine [RABJOHN et al., 1999]. *Ara h 4* hat ein

Molekulargewicht von geschätzten 61 kDa und die rekombinante Form von *Ara h 4* wurde durch Serum IgE von 53% der Patienten mit Erdnussallergie erkannt [KLEBER-JANKE et al., 1999]. *Ara h 3* [RABJOHN et al., 1999] und *Ara h 4* [KLEBER-JANKE et al., 1999] wurden von zwei unabhängigen Forschergruppen 1999 identifiziert und geklont. Eine Untersuchung der Homologie ergab, dass 91,3% der Aminosäuren zwischen *Ara h 3* und *Ara h 4* ident sind, und sie werden somit als isoforme Proteine erachtet [KOPPELMAN et al., 2003].

Ara h 5 hat ein Molekulargewicht von 14 kDa und gehört zu der Familie der pflanzlichen Profiline. *Ara h 5* weist zu 76% idente Aminosäuren mit Gräserprofilin und eine 83%ige Identität mit Sojaprofilin auf. Demzufolge können Personen mit Erdnussallergie allergisch auf Profiline von Birken- oder Gräserpollen reagieren und umgekehrt [WEN et al., 2007].

Ara h 6 verfügt über ein Molekulargewicht von 14,5 kDa und *Ara h 7* von 15,8 kDa. Beide Allergene weisen ähnliche Aminosäuresequenzen wie die Conglutin-Familie auf. *Ara h 6* und *Ara h 7* teilen 59% und 35% der Sequenzen mit *Ara h 2*, aber sie weisen nur eine 35%ige Identität untereinander auf. Demzufolge sind sie keine isoformen Proteine [WEN et al., 2007].

Ara h 8 verfügt über ein Molekulargewicht von 16,9 kDa. Seine Aminosäuresequenz ist zu 45,9% ident mit der von *Bet v 1*, dem wichtigsten Birkenpollenallergen, das zur PR-10 Familie zählt. Dadurch lässt sich die IgE-Kreuzreaktion zwischen den beiden Allergenen erklären. Des Weiteren könnte es darauf hindeuten, dass ein Zusammenhang zwischen einer Erdnussallergie und einer Birkenpollenallergie besteht. Folglich könnte die primäre Sensibilisierung durch Birkenpollen über die Atemwege ein neuer Weg für die Entwicklung einer Erdnussallergie bedeuten [MITTAG et al., 2004].

Ara h 9 ist ein unspezifisches Lipidtransferprotein und spielt eine wichtige Rolle bei Erdnussallgien in mediterranen Regionen. Zwei Isoforme von *Ara h 9* sind identifiziert, als rekombinante Allergene produziert und als immunologisch äquivalent eingestuft worden. Auch besteht der Verdacht, dass zwischen *Ara h 9* und dem Pfirsichallergen *Pru p 3* eine Kreuzreaktivität vorliegt [LAUER et al., 2009; KRAUSE et al., 2009].

2.2.4. Sesam-Allergene

Der Prozentsatz an Sesamallergien hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Vermutlich besteht hier ein Zusammenhang mit dem stark erhöhten Verzehr von Sesam-beinhaltenden Produkten. Da Hypersensitivitätsreaktionen auf Sesam dazu tendieren, von schwerer Natur zu sein und nicht selten in einer anaphylaktischen Reaktion enden, ist es um so wichtiger, alle klinisch relevanten Sesam-Allergene zu identifizieren [BEYER et al., 2002; COHEN et al., 2007].

Pastorello et al. (2001b) haben ein schwefelarmes 2S Albumin (*Ses i 1*) mit einem Molekulargewicht von 10 kDa als ein Hauptallergen der Sesamsamen identifiziert. Beyer et al. (2002) ist es mit Sequenzanalysen nach Edman gelungen *Ses i 2*, ein schwefelreiches 7 kDa schweres 2S Albumin, und *Ses i 3*, ein 7S Globulin vom Vicilin-Typ mit einem Molekulargewicht von 45 kDa, zu identifizieren. Sowohl Pastorello et al. (2001b) als auch Beyer et al. (2002) haben innerhalb der Familie der 2S Albumine Sequenzhomologien im Bereich von 16,6% und 49,3% zwischen Sesam, Paranuss, Walnuss, Rizinussamen, Sonnenblumensamen und Senfsamen nachgewiesen. Aufgrund der moderaten Homologie dieser 2S Albumine und der geringen Tendenz zu Kreuzreaktionen können sie als universelle Allergene angesehen werden. Die beiden 2S Albumine sind zu 35% ident und zu 47% homolog und stellen die Hauptallergene des Sesams dar [BEYER et al., 2002; PASTORELLO et al., 2001b; WOLFF et al., 2003].

Die Sequenzen von 7S Globulins *Ses i 3* sind zu 47% homolog mit *Jug r 2* der Walnuss und zu 36% mit dem Erdnuss-Allergen *Ara h 1*. Interessant ist, dass sich *Ses i 3* eine IgE-Bindungsstelle mit *Ara h 1* teilt. So kann spekuliert werden, dass das Erkennen dieser IgE-Bindungsstelle in einem Patienten klinischen Reaktionen sowohl auf Erdnuss als auch auf Sesam auslösen kann. Des Weiteren könnte damit erklärt werden, warum Sesam-spezifisches IgE, das keine klinischen Reaktionen auslöst, in Patienten mit Erdnussallergie nachgewiesen werden kann [BEYER et al., 2002].

Ses i 4 und *Ses i 5* sind zwei 17 und 15 kDa schwere Oleosine, die von Leduc et al. (2006) erstmals nachgewiesen wurden. Ihnen gelang es die Oleosine in der Ölfraktion,

die von den IgEs aller Patientenseren erkannt wurde, zu identifizieren. Auffällig ist die Intensität der Antikörperbindung, was vermuten lässt, dass die Mehrheit der Oleosine im Sesamöl präsent bleiben und in der Regel nicht denaturiert werden, da Sesamöl nur kalt gepresst wird. Ein Problem ist, dass Oleosine mittels SPT nicht immer erkannt werden. Falsch-negative SPTs können daraus resultieren, dass Oleosine im verwendeten Extrakt nicht vorhanden sind oder die Epitope im Inneren des Moleküls verborgen sind. Die aktuellen Detektionstests basieren auf der Identifizierung von Vicilinen oder anderen Speicherproteinen und sind somit für die Detektion von Sesamkontaminationen nicht ausreichend.

Beyer et al. (2007) haben zwei weitere Sesam-Allergene identifiziert. Es handelt sich dabei um zwei 11S Globuline, *Ses i 6* und *Ses i 7*. Wallowitz et al. (2007) hat kreuzreaktive Epitope zwischen den 11S Globulinen von Sesam und Walnuss nachgewiesen. Auch mit dem Globulinallergen der Erdnuss konnte eine Kreuzreaktivität festgestellt werden.

Der Stellenwert von anderen IgE-bindenden Sesamproteinen ist noch ungeklärt. Viele im Sesamextrakt nachgewiesenen Polypeptide mit unterschiedlichem Molekulargewicht scheinen IgE zu binden, aber weder ihre Identität noch ihre Relevanz sind bisher eindeutig bestimmt worden [BEYER et al., 2002].

2.3. Nachweismethoden für Lebensmittelallergene

Die Detektion und Quantifizierung von Lebensmittelallergenen ist schwierig, da Allergene meistens nur kleine Komponenten in einem sehr komplexen, heterogenen Lebensmittel sind und die Lebensmittelmatrix die Detektion ebenfalls beeinflussen, wenn nicht sogar behindern, kann [BUCHANAN et al., 2006]. Des Weiteren stellt sich die Frage, wie sensibel die Nachweismethode sein muss, da verschiedene Schwellenwerte für ein spezifisches Allergen existieren. Die zurzeit einzigen kommerziellen Methoden, die eine zuverlässige Detektion von Lebensmittelallergenen ermöglichen, beruhen auf immunchemischen Techniken, wie ELISA [POMS et al., 2004].

2.3.1. Immunchemische Methoden

Bei allen immunchemischen Methoden beruht die Detektion des Analyten auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion. Da die Antikörper spezifisch gegenüber einem bestimmten Antigen sind, eignen sich diese Methoden zum Nachweis sehr geringer Mengen eines Antigens in einer komplexen Matrix [MATISSEK et al., 2010]. Zu diesen Methoden zählen RAST, EAST, RIE, Immunoblotting und ELISA. Während RIE und Immunoblotting nur qualitative oder semiquantitative Ergebnisse liefern, gehören RAST, EAST und ELISA zu den quantitativen Methoden [POMS et al., 2004].

Kritisch betrachtet, existieren für immunchemische Nachweismethoden Detektionslimits. Da bei allen immunchemischen Methoden die Detektion auf der Antigen-Antikörper Reaktion beruht, ist demnach die Quantifizierung von der Qualität dieser Reaktion abhängig. Diese kann wiederum durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, unter anderem von der Spezifität der Immunglobuline. Da Antikörper nur Epitope und nicht das ganze Molekül erkennen, ist die Spezifität eines Antikörpers von der Einzigartigkeit des Epitops abhängig. Ein Mangel an Spezifität hat falsch-positive und falsch-negative Resultate aufgrund der Kreuzreaktionen zwischen eng verwandten Proteinen zur Folge. Des Weiteren bedeutet eine Variabilität der menschlichen und tierischen Seren eine Variabilität von IgE und IgG zwischen Individuen, was die Validität der Ergebnisse für andere Patienten limitiert [KIRSCH et al., 2009].

2.3.1.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die ELISA-Technik ist die am häufigsten eingesetzte Methode, um Allergene in Lebensmitteln nachzuweisen und zu quantifizieren. Die Immunreaktion wird an einer Festphase (Mikrotiterplatte) durchgeführt, an der entweder Antigene oder Antikörper haften. In der Regel kommen ein primärer Antikörper, der spezifisch gegenüber dem Antigen ist, und ein sekundärer Antikörper, an den ein Nachweissystem, gewöhnlich ein Enzym, das die Umsetzung eines farblosen Substrats in ein farbiges Produkt bewirkt, gekoppelt wird, zum Einsatz. Sandwich-ELISA und kompetitive ELISA werden

am häufigsten angewandt. Bei der Sandwich-ELISA kommen zwei verschiedene Antikörper zum Einsatz, die beide an das zu analysierende Protein, aber an unterschiedliche Epitope binden. Bei der kompetitiven ELISA werden dem primären Antikörper zwei Antigene angeboten, wobei ein Antigen an der Festphase immobilisiert ist und mit der antigenhaltigen Probe um die Antikörper konkurriert [CLARK und PAZDERNIK, 2009; MATISSEK et al., 2010].

2.3.1.2. State of the Art

Die erste ELISA für die Detektion von Erdnussproteinen in Lebensmitteln wurde von Hefle et al. (1994) entwickelt. Es handelte sich dabei um eine Sandwich-ELISA mit immobilisierten, monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Erdnussproteine mit Molekulargewichten zwischen 14 und 44 kDa, wobei ein polyklonales Antiserum (Hase) für die Detektion eingesetzt wurde. Mit dieser Methode konnten Erdnussproteine in verschiedenen Lebensmitteln mit einem Detektionslimit von $\leq 40\text{mg/kg}$ nachgewiesen werden. Diese neu eingeführte Methode öffnete die Tür für die Entwicklung etlicher anderer ELISA-Formate mit erhöhter Sensitivität für die Detektion von Erdnuss-Allergenen. Während der nächsten Jahre wurden viele neue Studien dazu veröffentlicht, hierzu ein paar Beispiele:

Yeung und Collins (1996) entwickelten eine kompetitive ELISA mit polyklonalen Antikörpern gegen ein Proteinextrakt gerösteter Erdnüsse mit einem Detektionslimit von $0,4\text{mg}$ Erdnussprotein/kg Lebensmittel. Holzhauser und Vieths (1999) entwarfen eine indirekt kompetitive ELISA mit einem kommerziell erhältlichen Erdnuss-spezifischen, polyklonalen Antiserum, das sich gegen native Erdnussproteine richtet, und die Detektion von versteckten Erdnussrückständen bis zu 2mg/kg erlaubt. Pomés et al. (2003) entwickelte eine ELISA mit monoklonalen Antikörpern gegen Ara h 1.

Verschiedene ELISA-Kits sind heute auch kommerziell erhältlich. Die angebotenen Kits ermöglichen semiquantitative oder quantitative Detektion. Sie unterscheiden sich hinsichtlich des Detektionsziels, dem Extraktionsprozedere, dem Detektionslimit, der Analysenzeit und der Kosten. Studien haben gezeigt, dass sich diese kommerziellen

Test-Kits für ein qualitatives Screening für die meisten Lebensmittel ausgezeichnet eignen, aber signifikant unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich Quantifizierung liefern. Ursachen dafür können Lebensmittelmatrix-Interaktionen, reduzierte Löslichkeit denaturierter Proteine und Unterschiede in der Antikörper Affinität/Erkennung der Erdnussproteine von verschiedenen Spezies und geografischen Ursprungs sein. Die Sensitivität dieser Tests bewegt sich im Bereich von 1mg/kg [POMS et al., 2004].

Ein multiallergenes Immunoassay, entwickelt nach dem ELISA-Modell, ermöglicht die simultane Bestimmung von zumindest 1µg/g Protein von jedem Erdnuss- und Schalennussallergen in Schokolade, aber ein Quantifizierungslimit konnte noch nicht festgelegt werden [REJEB et al., 2005]. Kürzlich wurde ELISA mit der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie kombiniert, um die Präzision der Detektion der einfachen ELISA zu erhöhen. Bei ELISA-ICP-MS wird der sekundäre Antikörper mit einem stabilen Isotop markiert, das für die Quantifizierung mit einem Massenspektrometer geeignet ist. Weniger als 2µg der Erdnuss-Allergene pro Gramm getreidehaltiger Matrix konnten detektiert werden [CARERI et al., 2007]. Des Weiteren kann ELISA auch mit PCR gekoppelt werden, wobei die DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert werden, dann mit einer Proteinsonde hybridisieren und die Detektion über ELISA erfolgt [POMS, 2004].

2.3.2. Molekularbiologische Verfahren

Grundsätzlich können alle Lebensmittelbestandteile, die Nukleinsäuren enthalten, mit molekularbiologischen Methoden untersucht werden. Diese Verfahren zeichnen sich durch ihre geringen Nachweisgrenzen und ihre hohen Spezifitäten aus. Besonders auf PCR-basierende Verfahren kommen in der Lebensmittelanalytik immer verstärkter zum Einsatz [MATISSEK et al., 2010].

Ein Kritikpunkt, der in Publikationen immer wieder auftritt, ist, dass die Quantifizierung bei diesen Methoden indirekt erfolgt, da nicht das Allergen selbst nachgewiesen wird, sondern eine spezifische DNA-Sequenz. Die Präsenz der Zielsequenz beweist nicht

unbedingt die Präsenz des Allergens selbst, aber sie indiziert die Ursprungsart im Falle einer Kontamination [KIRSCH et al., 2009].

2.3.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine der effektivsten Technologien in der Molekularbiologie. Mit ihrer Hilfe können spezifische Nukleotidsequenzen tausend- bis millionenfach kopiert bzw. amplifiziert werden, was die Möglichkeit schafft, sehr geringe Mengen an DNA schnell zu analysieren [INVITROGEN, 2008].

- **Grundprinzip der PCR**

Grundsätzlich gleicht der Reaktionsablauf der PCR dem der natürlichen Replikation. Als erster Schritt in einem PCR-Zyklus wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang thermisch denaturiert, wodurch einzelsträngige DNA-Template Moleküle entstehen. An diese Template-DNA binden die Startermoleküle, die sogenannten Primer, die zu den Enden der Template-DNA komplementär sind. Von deren 3'-Ende ausgehend synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen Doppelstrang. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung dieser einzelnen Reaktionsschritte, um so tausende Kopien eines bestimmten DNA-Abschnitts zu erhalten [BANGSOW et al., 2007; CLARK und PAZDERNIK, 2009].

- **Überblick über die PCR-Komponenten**

DNA-Template: DNA wird für alle PCR-Anwendungen als Template verwendet. Es kann sich um genomische DNA, rekombinante DNA in verschiedenen Vektoren oder virale DNA handeln. Für spezielle PCR-Verfahren kann die DNA auch zuvor durch enzymatische Schritte wie Restriktionen oder Ligationen modifiziert werden [BANGSOW et al., 2007]. Üblicherweise werden bei der PCR für klonierte Matrizen Mengen unter einem Nanogramm und für genomische DNA Mengen unter einem Mikrogramm eingesetzt. Theoretisch lässt sich auch nur ein einziges Molekül eines Templates vervielfältigen [NEWTON und GRAHAM, 1994].

Primer: Die richtige Primerwahl ist ausschlaggebend für eine effektive PCR, da von ihnen im Wesentlichen die Spezifität, die Sensitivität und die Reproduzierbarkeit abhängen.

In der Regel besteht ein Primer aus 18 bis 30 Nukleotiden. Bei der Nukleotidzusammensetzung ist zu beachten, dass der GC-Gehalt sich zwischen 40% und 60% bewegt. Komplementarität von zwei oder drei Basen an den 3'-Enden zwischen Primerpaaren ist zu vermeiden, da die Bildung von Primerdimeren und anderen stabilen Sekundärstrukturen unerwünscht ist. Das 3'-Ende sollte auch kein T enthalten, da Basenfehlpaarungen bei Primern mit endständigem T häufiger auftreten. Des Weiteren sollten die Schmelztemperaturen der beiden Primer eines Paares gleich sein, um optimale Reaktionsbedingungen einstellen zu können [BANGSOW et al., 2007].

DNA-Polymerase: Zu der Aufgabe der DNA-Polymerase gehört es, aus einzelnen Desoxynucleosidtriphosphaten lange Polynucleotidketten zu bilden. Es können verschieden DNA-Polymerasen je nach Problemstellung für die PCR eingesetzt werden. Am häufigsten wird die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Das Temperaturoptimum dieses Enzyms liegt bei 75°C. Bei dieser Temperatur wird die DNA mit einer Geschwindigkeit von 35 bis 100 Nukleotiden pro Sekunde synthetisiert. Das Enzym verfügt über eine Halbwertszeit von 5 Minuten bei 100°C.

Einer der Hauptfaktoren, der die Spezifität der PCR beeinflusst, ist die Tatsache, dass die Taq DNA-Polymerase eine Restaktivität bei niedrigen Temperaturen aufweist. Das hat zur Folge, dass sich Primer unspezifisch an die DNA anlagern oder miteinander in Wechselwirkung treten, was wiederum der Polymerase ermöglicht, unspezifische Produkte zu bilden. Dieses Problem kann minimiert werden, indem „hot-starting“ Enzyme verwendet werden. Diese stellen sicher, dass die Taq-Polymerase während der Reaktionsvorbereitung und des anfänglichen DNA Denaturierungsschritts nicht aktiv ist [BANGSOW et al., 2007; INVITROGEN, 2008].

Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs): Hochreine dNTPS sind als vier einzelne Stammlösungen oder als fertige Mischung zu kaufen. dNTP-Konzentrationen von rund

100 μM werden gewöhnlich für die PCR verwendet. Die optimalen dNTP-Konzentrationen hängen von der MgCl_2 -Konzentration, Stringenz der Reaktion, Konzentration der Primer, Länge der DNA-Kopien und Anzahl der PCR-Zyklen ab [NEWTON und GRAHAM, 1994].

Magnesiumchlorid (MgCl_2): Aufgabe der Mg^{2+} -Ionen ist es, mit den dNTPs einen löslichen Komplex zu bilden, der für den dNTP-Einbau wesentlich ist. Auch stimulieren sie die Polymeraseaktivität und erhöhen die T_m . Die Endkonzentration von MgCl_2 in einem Reaktionsansatz kann über einen Bereich von 0,5-5,0 mM variieren, wobei normalerweise Konzentrationen von 1,0-1,5 mM optimal sind. Die Wahl der geeigneten MgCl_2 -Konzentration ist nicht zu vernachlässigen, da sie Spezifität und Ausbeute der PCR stark beeinflusst. Eine zu niedrige Mg^{2+} -Konzentration äußert sich in einer zu geringen Ausbeute, während eine verstärkte Bildung unspezifischer Produkte eine Folge einer zu hohen Mg^{2+} -Konzentration sein kann [NEWTON und GRAHAM, 1994].

- **Die drei Phasen der PCR**

Denaturierung: Das Erhitzen hat zur Folge, dass durch Lösen der Wasserstoffbrücken die DNA-Doppelhelix in zwei Einzelstränge denaturiert wird. Die Temperatur sollte so gewählt werden, dass sie für die verwendete DNA-Polymerase geeignet ist (gewöhnlich 95°C). Die Dauer der Denaturierung kann erhöht werden, wenn GC-Gehalt des Templates hoch ist [INVITROGEN, 2008; LOTTSPERICH und ENGELS, 2006].

Annealing: Eine anschließende, schnelle Temperaturreduktion bewirkt, dass sich die Primer an die Template-DNA anlagern. Die optimale Annealingtemperatur variiert von Primer zu Primer. Als Richtwert kann für die Annealingtemperatur der Wert der berechneten Schmelztemperatur $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$ minus 5°C herangezogen werden. Die optimale Annealingtemperatur muss aber in der Regel empirisch ermittelt werden und liegt in der Praxis oft oberhalb der berechneten Schmelztemperatur [BANGSOW et al., 2007; INVITROGEN, 2008].

Elongation: Bei 70°C bis 72°C ist die Aktivität der Taq-DNA-Polymerase optimal und die Geschwindigkeit der Primerverlängerung erhöht sich auf bis zu 100 bp pro Sekunde. Wenn das gebildete Amplikon sehr klein ist, wird dieser Schritt oft mit der Annealingphase kombiniert [INVITROGEN, 2008].

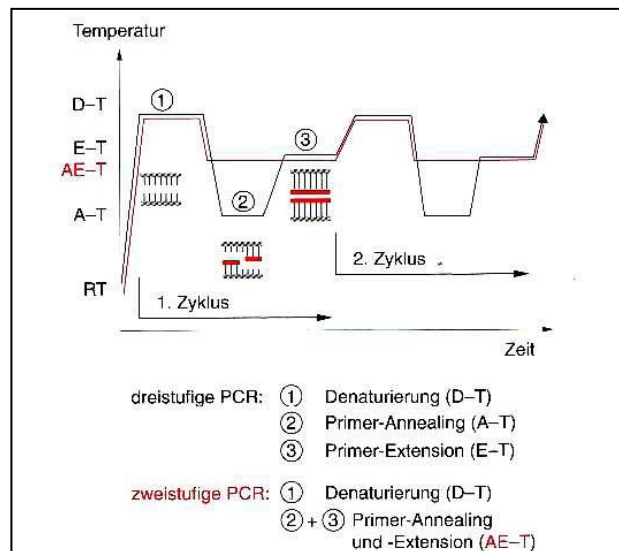


Abb. 2. 5. Schema für ein zwei- bzw. dreistufiges Temperatur/Zeitprotokoll [LOTTSPREICH und ENGELS, 2006]

Um sicher zu stellen, dass alle Template-Moleküle einzelsträngig vorliegen, wird gewöhnlich vor dem ersten Zyklus eine längere Denaturierung von 3-5 Minuten durchgeführt. Damit die Taq-Polymerase alle synthetisierten DNA-Stränge vervollständigen kann, empfiehlt es sich nach dem letzten Zyklus einen Polymerisationsschritt (gewöhnlich 10 Minuten) anzuhängen [BANGSOW et al., 2007].

2.3.2.2. Real-time PCR

Bei der konventionellen PCR (Endpoint-PCR) erfolgt Detektion und Quantifizierung der amplifizierten Sequenzen nach dem letzten PCR-Zyklus am Ende der Reaktion z.B. mittels Gelelektrophorese. Im Gegensatz dazu kann bei der Real-time PCR die Menge der gebildeten PCR-Produkte nach jedem PCR-Zyklus gemessen werden, daher auch der Name Real-time PCR, also „Echtzeit-PCR“. Diese Möglichkeit, die Reaktion während ihrer exponentiellen Phase beobachten zu können, erlaubt es, die Konzentration der

anfänglichen DNA mit großer Präzision zu bestimmen [BIORAD, 2006; INVITROGEN, 2008].

- **Grundprinzip der Real-time PCR**

Die PCR amplifiziert die DNA theoretisch exponentiell, also die Anzahl der vorhandenen Moleküle verdoppelt sich in jedem Zyklus. Die Anzahl der Zyklen und die Menge der PCR-Endprodukte können im Vergleich mit bekannten Standards dazu herangezogen werden, die Konzentration des anfänglichen genetischen Materials zu bestimmen. Zu beachten ist, dass die PCR in den ersten Zyklen keinesfalls exponentiell ist und bei fortgeschrittener Reaktion in eine Plateauphase übergeht. Daher darf die Menge an DNA nur in der exponentiellen Amplifikationsphase gemessen werden. Diese Phase kann bei der Endpunkt-PCR nur schwer festgestellt werden. Um dieses Problem zu beheben, wurde die Technik der quantitativen Real-time PCR entwickelt.

Bei der Real-Time PCR wird die Menge der DNA nach jedem Zyklus mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern, die in das PCR-Produkt eingebaut werden, gemessen. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals ist direkt proportional zur Anzahl der PCR-Produkte. Spezialisierte Thermocycler, ausgestattet mit einem Fluoreszenzdetektionssystem, zeichnen die Änderung des Fluoreszenzsignals auf.

Vorteile der Real-time PCR sind die Möglichkeiten, den Fortschritt der PCR-Reaktion in Echtzeit zu verfolgen und darzustellen, die Menge der gebildeten Amplikone nach jedem Zyklus präzise zu messen, Amplifikation und Detektion in einem Lauf zu kombinieren und des Weiteren ist der dynamische Bereich der Reaktion größer [BANGSOW et al., 2007; BIORAD, 2006; INVITROGEN, 2008].

Die wesentlichsten Reaktionsschritte sind auch für eine Real-time PCR-Reaktion Denaturierung, Annealing und Elongation.

- **Überblick über Real-time PCR Komponenten**

DNA-Template: Die Grundinformationen sind Kapitel 2.3.2.1 zu entnehmen. Es sollten zwischen 10 bis 1000 Kopien der Template Nukleinsäure für jede Real-time Reaktion verwendet werden. Sehr hohe Konzentrationen an Templates erhöhen die Anzahl an Kontaminanten und reduzieren die Effizienz [INVITROGEN, 2008].

Primer: Einer der wichtigsten Parameter bei der Real-time PCR ist ein gutes Primerdesign. Die Länge des Amplikons sollte schätzungsweise zwischen 80 bis 250 bp liegen, da längere Produkte nicht so effizient amplifizieren. Optimale Ergebnisse werden bei Primerkonzentrationen zwischen 50 und 500 nM erzielt. Eine Endkonzentration von 200 nM je Primer ist für die meisten Reaktion am effektivsten. Im Allgemeinen sollten Primer 18 bis 24 Nucleotide lang sein, was in praktischen Annealingtemperaturen resultiert. Natürlich muss der Primer spezifisch für die Zielsequenz und frei von internen Sekundärstrukturen sein. Primerpaare sollten kompatible Schmelztemperaturen (max. 5°C auseinander) und einen GC-Gehalt von rund 50% aufweisen. Ein hoher GC-Gehalt resultiert in der Bildung von stabilen unvollständigen Hybriden, während ein hoher Anteil an AT die Schmelztemperatur von perfekt gebildeten Hybriden senkt. Wenn möglich sollte das 3' Ende des Primers reich an GC Basen (GC-clamp) sein um die Anlagerung an dem Ende, das verlängert wird, zu erhöhen. Des Weiteren sollten die Sequenzen analysiert werden, um Komplementarität zu vermeiden und Hybridisation zwischen Primern vorzubeugen.

Primerdimere entstehen durch eine Interaktion zwischen vorwärts-rückwärts, vorwärts-vorwärts oder rückwärts-rückwärts Primern. Wenn die Dimerisation schrittweise stattfindet, wie es oft der Fall ist, kann die DNA-Polymerase diese elongieren mit dem Ergebnis, dass Produkte mit ähnlicher Größe wie das Amplikon entstehen. Grundsätzlich gilt, je geringer die Konzentration der Ausgangs-DNA, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten von Primerdimeren. Bedenklich ist, dass das Fluoreszenzsignal von Dimeren sich mit dem Signal von unspezifischen Produkten vermischt und so die Ergebnisse beeinflusst. Ein weiteres Problem ist, dass dadurch die Effizienz der Reaktion außerhalb des gewünschten Bereichs von 90 bis 110 % liegen

kann, dadurch die dynamische Bandbreite sinkt und eine verminderte Sensibilität zur Folge hat.

Um zu testen, ob Primerdimere präsent sind, eignet sich die Gelelektrophorese. Hierbei erscheinen die Dimere als diffuse, verschmierte Banden nahe dem Gelgrund. Es gibt Reaktionen, wo Primerdimere zwar präsent sind aber nicht zwangsläufig stören. Eine Annahme ist, dass Primerdimere in der NTC vorhanden sind, und durch die Zugabe der Template-DNA verschwinden. Das ist nicht überraschend, da durch das Fehlen der DNA die Primer wesentlich stärker dazu neigen miteinander zu reagieren, aber sobald DNA zur Verfügung steht, rücken Dimerformationen in den Hintergrund [BIORAD, 2006; FINNZYMES, 2009; INVITROGEN, 2008].

Fluoreszenzsysteme: Es gibt verschieden Fluoreszenzdetektionssysteme, wobei die Basis aller die Bildung eines Fluoreszenzsignals proportional zu der Menge der gebildeten PCR-Produkte darstellt. Das gängigste System beruht auf dem Einsatz von DNA-bindenden Farbstoffen, die nach ihrer Bindung an doppelsträngige DNA-Moleküle verstärkt fluoreszieren. Ein Nachteil dieser einfach anzuwendenden Technologie ist ihr Mangel Spezifität, da die Farbstoffe sich nicht nur in die Ziel-DNA, sondern in alle dsDNA-Produkte einlagern. Man kann sich behelfen, indem eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wird, an Hand derer sich die Spezifität der PCR-Produkte abschätzen lässt.

Ein weiteres Detektionssystem beruht auf der Basis fluoreszierender Primer. Bei dieser Technologie heftet sich das Fluorophor an den spezifischen Primer und seine Fluoreszenz steigt, wenn er im Zuge der Amplifikation in das PCR-Produkt eingebaut wird. Diese Technologie zeichnet sich durch hohe Sensibilität und Spezifität aus.

Als drittes System sei die auf sondenbasierende Detektion erwähnt. Dieses Detektionssystem ist wesentlich teurer und aufwändiger zu handhaben als die beiden anderen Technologien, dafür aber sehr sensibel und spezifisch [BANGSOW et al., 2007; BIORAD, 2006; INVITROGEN, 2008].

Die grundlegenden Informationen zu DNA-Polymerasen, dNTPS und $MgCl_2$ -Konzentration sind Kapitel 2.3.2.1 zu entnehmen.

- **Real-time PCR Terminologie**

Baseline: Die Baseline bezieht sich auf die Höhe des Fluoreszenzsignals während der ersten PCR-Zyklen, wo es nur zu geringfügigen Änderungen in der Höhe des Fluoreszenzsignals kommt. Diese niederen Signale können als Hintergrundrauschen der Reaktion betrachtet werden. Die Baseline wird für jede Reaktion entweder manuell oder automatisch vom Analysenprogramm festgelegt. Bei der Festlegung der Baseline ist zu beachten, dass der Zyklus, in dem sich das Amplifikationssignal über das Hintergrundrauschen erhebt, nicht mit einbezogen werden darf. Wenn verschiedene Experimente miteinander verglichen werden sollen, empfiehlt es sich die Baseline immer auf dieselbe Art und Weise zu definieren [INVITROGEN, 2008].

Threshold: Als Threshold bzw. Schwellenwert wird die Höhe des Amplifikationssignals bezeichnet, die einen statistisch signifikanten Anstieg über das kalkulierte Baseline-Signal darstellt. Der Threshold wird so festgelegt, dass deutlich zwischen dem relevanten Amplifikationssignal und dem Hintergrundrauschen unterschieden werden kann. Gewöhnlich legt die Software den Threshold als ein 10faches der Standardabweichung des Fluoreszenzwertes der Baseline fest. Grundsätzlich kann der Threshold beliebig irgendwo in der exponentiellen Phase gesetzt werden. Sollen Experimente miteinander verglichen werden, muss ein einheitlicher Threshold gewählt werden [BIORAD, 2006; INVITROGEN, 2008].

Threshold Cycle (C_t): Den Zyklus, in welchem das Fluoreszenzsignal den Threshold kreuzt, bezeichnet man als Threshold Cycle (C_t -Wert) oder auch als Cycle of quantification (C_q). Der C_t -Wert wird verwendet um die Menge der anfänglichen DNA zu bestimmen. Hohe Menge an Ausgangs-DNA ergibt einen niedrigen C_t -Wert und umgekehrt [BIORAD, 2006; INVITROGEN, 2008].

Exponentielle Phase: Die Quantifizierung sollte im frühen Teil der exponentiellen Phase stattfinden. Am Beginn der exponentiellen Phase sind alle Komponenten im

Überfluss vorhanden, die DNA-Polymerase ist noch sehr effizient und das PCR-Produkt, das in geringer Menge präsent ist, konkurriert nicht mit den Anlagerungsmöglichkeiten der Primer, daher sind die Daten in diesem Abschnitt präziser [BIORAD, 2006; INVITROGEN, 2008].

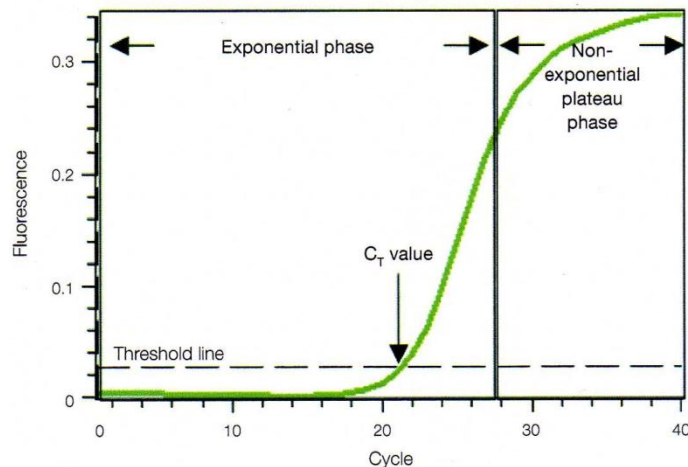


Abb. 2. 6. Schematische Darstellung einer Amplifikationskurve [BIORAD, 2006]

Schmelzkurve: Selbst bei sehr gut designten Primern und optimalen Reaktionsbedingungen besteht immer noch ein gewisses Restrisiko, dass im Zuge der Amplifikation auch unspezifische PCR-Produkte entstehen. Um die Spezifität der amplifizierten Produkte zu bekräftigen, wird im Anschluss an den letzten PCR-Zyklus eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei der Schmelzkurvenanalyse wird eine Änderung der Fluoreszenz registriert, wenn die doppelsträngige DNA mit eingebautem Fluoreszenzfarbstoff durch kontinuierliche Temperaturerhöhung in Einzelstränge dissoziiert. Dadurch wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und die Fluoreszenzabnahme graphisch festgehalten.

Die Schmelztemperatur eines DNA-Fragments ist von dessen Länge, GC-Gehalt, Sequenz, Strangkomplementarität, Konzentration und Pufferkomponenten abhängig. Die Schmelztemperatur von Primerdimeren ist gewöhnlich niedriger als die der Zielsequenz, aufgrund der geringeren Größe von Primerdimeren [BIORAD, 2006; FINNZYMES, 2009; INVITROGEN, 2008].

Absolute Quantifizierung: Für die absolute Quantifizierung werden externe Standards wie zum Beispiel eine Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration herangezogen. Diese Verdünnungsreihe wird als Standardreihe definiert und umfasst in der Regel fünf Verdünnungsstufen, wobei die Konzentration der Probe innerhalb der Standardkonzentrationen liegen muss. Standards und Proben werden amplifiziert, eine Standardgerade erstellt, mittels derer die unbekannten Proben quantifiziert werden können [INVITROGEN, 2008].

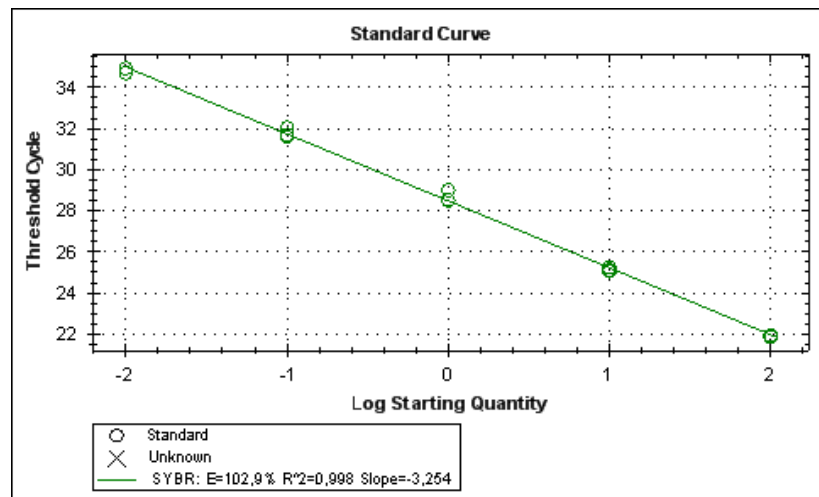


Abb. 2. 7. Beispiel für eine Standardkurve

Slope: Die Steigung (Slope) der Standardkurve gibt Auskunft über die Effizienz einer Reaktion. Eine Steigung von -3,32 korrespondiert mit einer Effizienz von 100%.

$$\text{Effizienz: } E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1 \quad \times 100 \text{ für Wert in \%}$$

Im Idealfall beträgt die Effizienz einer Reaktion 100%, was bedeutet die Templates haben sich während der exponentiellen Phase von Zyklus zu Zyklus verdoppelt. Die tatsächliche Effizienz gibt nützliche Informationen über die Reaktion wieder. Die Effizienz kann von der Länge, der Sekundärstruktur und dem GC-Gehalt des Amplikons beeinflusst werden. Eine gute Reaktion sollte eine Effizienz zwischen 90% und 110% aufweisen, und somit eine Steigung zwischen -3,58 und -3,10 [INVITROGEN]. BIORAD (2006) grenzt den Toleranzbereich für die Effizienz mit 90% bis 105% stärker ein.

Ursache für eine Effizienz weniger als 90% können beispielsweise nicht optimale Konzentrationen der einzelnen Komponenten oder mangelnde Enzymqualität sein. Sind PCR-Inhibitoren in einem oder mehreren Reagenzien vorhanden, kann die Effizienz Werte über 110% annehmen. Weitere Ursachen für hohe Effizienzwerte können Pipettierfehler und die Koamplifikation von unspezifischen Produkten, wie Primerdimere, sein [BIORAD, 2006; INVITROGEN, 2008].

Korrelationskoeffizient: R^2 gibt an, wie gut die Daten der Standardgeraden korrelieren. Er spiegelt die Linearität der Geraden wider und ermöglicht ein Abschätzen der Variabilität der Replikate. Im Idealfall beträgt R^2 1. In der Praxis hingegen stellt 0,999 den maximal erreichbaren Wert dar. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der erhaltenen C_t -Werte von Mehrfachansätzen senkt den Wert von R^2 . Für effiziente Real-time PCR-Reaktionen muss R^2 Werte größer 0,980 annehmen [BIORAD, 2006; INVITROGEN, 2008].

2.3.2.3. State of the Art

Hird et al. (2003) publizierten als erste ein Real-time PCR Protokoll für die Detektion von Erdnüssen in Lebensmittel. Mit dieser Methode wurde ein spezifisches Fragment von *Ara h 2* mit einem Detektionslimit von 2 ppm amplifiziert. Die präsentierten Daten bezogen sich auf Verdünnungen von reinen Erdnuss-DNA-Extrakten und einigen realen Lebensmittelproben. Stephan und Vieths (2004) entwickelten ebenfalls eine Real-time PCR für die Detektion von Erdnuss-spezifischer DNA (*Ara h 2*) mit einem Detektionslimit < 10 ppm Erdnuss in verarbeiteten Lebensmittel. Sie verglichen die Ergebnisse der Proben, die sowohl mit Real-time PCR als auch mit ELISA analysiert wurden, mit dem Resultat, dass mit beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Watanabe et al. (2006) berichtete über konventionelle PCR kombiniert mit Gelelektrophorese. In all diesen Publikationen wurde die PCR nur für einen qualitativen Nachweis eingesetzt.

Scaravelli et al. (2008) entwarfen drei Real-time PCRs, die darauf setzten, die für das Erdnuss-Allergen *Ara h 3* kodierenden Sequenzen nachzuweisen. Der lineare Bereich,

über welchen die Erdnuss-DNA mit angemessener Präzision nachgewiesen werden konnte, lag zwischen 10 und 10 000 mg/kg Kekse. Scaravelli et al. (2009) erweiterten ihre Untersuchungen und berücksichtigten den Einfluss von Hitzebehandlung auf die Nachweisbarkeit von Erdnuss-Allergenen. Sie verglichen die Ergebnisse von zwei verschiedenen ELISA Kits mit denen der drei Real-time PCR-Methoden und kamen zu dem Schluss, dass mit beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse erhalten werden. Des Weiteren bestätigte sich ihr Verdacht, dass durch Rösten die Nachweisbarkeit der Erdnuss-Allergene (*Ara h 1-3*) bei beiden Methoden stark reduziert wird.

Wissenschaftliche Publikationen über den Nachweis von Sesam-Allergenen sind rar. Schöringhumer und Cichna-Markl (2007) entwickelten als erste eine Real-time PCR für den Nachweis von Sesam-Allergenen. Die Methode wurde für den Nachweis des *Ses i 1* kodierenden Gens ausgerichtet. In allen untersuchten Proben konnte Sesam-DNA erfolgreich amplifiziert werden, auch in jenen wo bekannt war, dass hemmende Komponenten vorhanden waren. Mustorp et al. (2008) kreierten ebenfalls eine effiziente Real-time PCR-Methode für den Nachweis von *Ses i 1*. Schöringhumer et al. (2009) zeigten, dass mit einer Duplex Real-time PCR-Methode die simultane Detektion von potentiell allergenem Sesam und Haselnuss in Lebensmitteln möglich ist. Husain et al. (2010) entwarfen eine kompetitive ELISA für den Nachweis von Sesam in Lebensmitteln. Mittels ELISA konnte Sesam in allen untersuchten Produkten, die Sesam eventuell enthalten, mit einem Detektionslimit von 5µg Sesamprotein/g Lebensmittel nachgewiesen werden. Die Produkte wurden ebenfalls mittels Real-time PCR [SCHÖRINGHUMER und CICHNA-MARKL, 2007] analysiert, mit dem Resultat, dass die erhaltenen Ergebnisse beider Methoden übereinstimmen.

3. Material und Methoden

3.1. Probenmaterial

Folgende pflanzliche Proben stehen für die Untersuchung diverser Allergene zur Verfügung:

Probenbezeichnung	
Cashew	<i>Anacardium occidentale</i>
Erdnuss	<i>Arachis hypogaea</i>
Gerste	<i>Hordeum vulgare</i>
Haselnuss	<i>Corylus avellana</i>
Kastanie	<i>Castanea sativa</i>
Macadamia	<i>Macadamia ternifolia</i>
Mandel	<i>Prunus dulcis</i>
Paranuss	<i>Bertholletia excelsa</i>
Pekannuss	<i>Carya illinoensis</i>
Pinienkerne	<i>Pinus pinea</i>
Pistazie	<i>Pistacia vera</i>
Roggen	<i>Secale cereale</i>
Sesam	<i>Sesamum indicum</i>
Walnuss	<i>Juglans regia</i>
Weizen	<i>Triticum aestivum L</i>

Tab. 3. 1. Übersicht über die für die Analysen verfügbaren Proben

Das Ausgangsmaterial wird fein zermahlen und tiefgekühlt gelagert. Aus jeder Probe wird anschließend die DNA isoliert, die für weitere Analysen benötigt wird.

3.2. DNA-Isolierung

3.2.1. Prinzip

Es gibt verschiedene Methoden, Nukleinsäuren zu isolieren, und daher richtet sich die Wahl der Methode nach der Art der zu isolierenden Nukleinsäure und ihrem Verwendungszweck. Die im Rahmen dieser Diplomarbeit eingesetzte Methode basiert auf der Silikageltechnologie. Dieses Verfahren setzt darauf, dass Nukleinsäuren in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotropher Salze an Silikaoberflächen binden. Anschließend wird die Oberfläche mit alkoholhaltigen Puffern gewaschen und die DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen eluiert [GRIESS et al., 2007; MATISSEK et al., 2010].

Der QIAGEN DNeasy^R Tissue Kit (50) ermöglicht eine einfache und sichere Präparierung der Nukleinsäuren. Die wichtigsten Schritte umfassen Lyse der Probe, Binden der Nukleinsäuren an die Silikamembran, Waschen zur Beseitigung der Kontaminationen und Eluieren der reinen Nukleinsäuren [QIAGEN, 2006].

3.2.2. Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Hersteller	Beschreibung
Analysenwaage	Mettler Toledo	Mettler AE 163
DNeasy Säule	Qiagen	DNeasy ^R Blood & Tissue Kit (50)
Fingerschüttler	Velp Scientifica	Vortex mixer
Handschuhe	Top Glove	Latex, puderfrei
Heizblock	Biozym	Mixing Block MB-102
Kolbenhubpipette	Gilson	diverse
Pipettenspitzen	Biozym	diverse, steril
Reaktionsgefäße	Biozym	1,5 ml und 2 ml, steril
Spatel	-	-
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5415R

Tab. 3. 2. Geräte und Hilfsmittel für die DNA-Isolierung

3.2.3. Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller	Beschreibung
AE-Puffer (Elution buffer)	Qiagen	DNeasy ^R Blood & Tissue Kit (50)
AL Puffer (Lysis buffer)	Qiagen	DNeasy ^R Blood & Tissue Kit (50)
ATL Puffer (Tissue lysis buffer)	Qiagen	DNeasy ^R Blood & Tissue Kit (50)
AW1 Puffer (Wash buffer 1)	Qiagen	DNeasy ^R Blood & Tissue Kit (50)
AW2 Puffer (Wash buffer 2)	Qiagen	DNeasy ^R Blood & Tissue Kit (50)
Ethanol	Merck	70%ig
Proteinase-K	Qiagen	DNeasy ^R Blood & Tissue Kit (50)

Tab. 3. 3. Reagenzien und Lösungen für die DNA-Isolierung

3.2.4. Durchführung

Für die DNA-Isolierung werden 50mg der entsprechenden Probe (siehe Tabelle 3.1.) in ein steriles 1,5µl Eppendorfgefäß eingewogen. Die Durchführung der Isolierung erfolgt nach dem Protokoll QIAGEN DNeasy^R Tissue Kit (50):

- Zugabe von 180µl ATL Puffer und 20µl Proteinase-K – gut vortexen
- 4 Stunden bei 55°C im Heizblock inkubieren – alle 15 Minuten gut vortexen, um eine vollständige Lyse des Gewebes zu erreichen.

- Zugabe von 200µl AL Puffer – gut vortexen
- 10 Minuten bei 70°C im Heizblock inkubieren
- Zugabe von 200µl Ethanol – gut vortexen
- DNeasy-Säule auf Sammelröhrchen setzen und Lösung auf die DNeasy-Säule pipettieren (Wichtig ist es, die Lösung vollständig zu überführen, was durch die eventuell starke Schaumbildung schwierig ist. Behelfen kann man sich, indem man die Schaumblasen mit einer sterilen Pipettenspitze zersticht.)
- 1 Minute bei 8 000rpm zentrifugieren – eventuell auch länger (Lösung soll vollständig durch die Säule gewandert sein.)
- DNeasy-Säule auf neues Sammelröhrchen setzen – der Inhalt des ersten Sammelröhrchens kann verworfen werden
- Zugabe von 500µl AW1 Puffer
- 1 Minute bei 8 000rpm zentrifugieren – eventuell auch länger
- DNeasy-Säule auf neues Sammelröhrchen setzen – der Inhalt des zweiten Sammelröhrchens kann verworfen werden
- Zugabe von 500µl AW2 Puffer
- 3 Minuten bei 13 200rpm zentrifugieren – DNeasy-Membran soll trocken sein
- Inhalt des Sammelröhrchens verwerfen und DNeasy-Säule auf ein steriles 1,5ml Eppendorfgefäß setzen
- Zugabe von 100µl AE-Puffer direkt auf die DNeasy-Säule (Membran nicht berühren) – AE-Puffer bewirkt das Herauslösen der DNA aus der Membran
- 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 Minute bei 8 000rpm zentrifugieren – Inhalt nicht verwerfen!
- Zugabe von 100µl AE-Puffer direkt auf die DNeasy-Säule
- 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 Minute bei 8 000rpm zentrifugieren

Ein Aliquot von 20µl wird für weitere Analysen verwendet. Die Verwendung eines Aliquots soll das häufige Auftauen und Einfrieren der DNA reduzieren und das Risiko einer Kontamination minimieren. Die restliche DNA-Lösung wird tiefgekühlt gelagert.

3.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

3.3.1. Prinzip

Für eine schnelle Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren eignet sich eine Absorptionsmessung im UV-Bereich. In der Regel können anhand des Absorptionsspektrums auch Rückschlüsse auf die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren gezogen werden. Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wird bei einer Wellenlänge von 260nm durchgeführt. Hierbei gilt der Zusammenhang, dass eine Extinktion von 1 50µg/ml doppelsträngige DNA, 40µg/ml RNA und 33µg/ml Oligonucleotide entsprechen [MATISSEK et al., 2010; NICHOLL, 2002; STASSEN, 2007].

Mit Hilfe des Quotienten E260/E280 kann die Reinheit des Nukleinsäurepräparats abgeschätzt werden, wobei eine sauber isolierte Probe Werte zwischen 1,8 und 2 aufweisen sollte. Wichtig ist anzumerken, dass der Quotient von pH-Wert und Ionenstärke der zumessenden Probe abhängig ist. Ein Quotient unter 1,8 deutet auf eine mögliche Kontamination mit Proteinen hin, was sich in einer verminderten Reaktionseffizienz bei Real-time PCR äußert [STASSEN, 2007; INVITROGEN, 2008].

3.3.2. Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Hersteller	Beschreibung
Fingerschüttler	Velp Scientifica	Vortex mixer
Fotometer	Hitachi	U 2000
Kolbenhubpipetten	Gilson	diverse
Pipettenspitzen	Biozym	diverse
Quarzküvetten	-	-
Reaktionsgefäße	Biozym	1,5ml
Zentrifuge	Biosan	Combi Spin FVL-2400N

Tab. 3. 4. Geräte und Hilfsmittel für die Bestimmung der DNA-Konzentration

3.3.3. Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller	Beschreibung
AE-Puffer	Qiagen	DNeasy ^R Blood & Tissue Kit (50)
UHQ-Wasser	-	steril

Tab. 3. 5. Reagenzien und Lösungen für die Bestimmung der DNA-Konzentration

3.3.4. Durchführung

Um den Verbrauch der 100%igen DNA-Lösung gering zu halten, wird eine Verdünnung der zu untersuchenden DNA-Lösung hergestellt, da ein Volumen von mindestens 50µl für jede Messung benötigt wird. Gewöhnlich liefert eine 1:100 Verdünnung verwertbare Ergebnisse:

- in einem 1,5ml Eppendorfgefäß 495µl vollentsalztes Wasser vorlegen und 5µl 100%ige DNA-Lösung hinzu pipettieren.
- Für den Blindwert werden anstelle der 100%igen DNA-Lösung 5µl AE-Puffer verwendet.
- gut vortexen und kurz zentrifugieren
- in eine Quarzküvette überführen (immer die gleiche verwenden)

Es wird ein Wellenlängenscan durchgeführt. Die O_D -Werte bei 260nm und 280nm sind wesentlich:

- Fotometer gegen Luft auf Null abgleichen
- Fotometer gegen Blindwert auf Null abgleichen
- Verdünnungen nach einander messen

Nach einer Messung die Küvette entleeren, zweimal mit Wasser spülen, einmal mit der Verdünnung der nächsten Probe spülen, dann erst wieder messen.

3.3.5. Berechnung

Die Berechnung der DNA-Konzentration beruht auf einer simplen Schlussrechnung:

50µg DNA/ml entsprechen einem O_D -Wert bei 260nm von 1

X µg DNA/ml entsprechen einem O_D -Wert bei 260nm von X

Berechneter Wert X wird mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

Für die Berechnung der Reinheit der Probe wird der O_D -Wert gemessen bei 260nm durch den O_D -Wert gemessen bei 280nm dividiert.

3.4. Speziesspezifische PCR

3.4.1. Prinzip

Das zu amplifizierende DNA-Template wird thermisch denaturiert, das spezifische Primerpaar bindet an das einzelsträngige DNA-Template, und eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert einen neuen Doppelstrang. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung dieser einzelnen Reaktionsschritte, um so tausende Kopien eines bestimmten DNA-Abschnitts zu erhalten. Details sind in Kapitel 2.3.2.1 nachzulesen.

3.4.2. Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Hersteller	Beschreibung
Fingerschüttler	Velp Scientifica	Vortex mixer
Handschuhe	Top Glove	Latex, puderfrei
Kolbenhubpipetten	Gilson	diverse
Kühlblock	Isocube	-
Pipettenspitzen	Biozym	Diverse, steril
Reaktionsgefäße	Biozym	1,5ml und 0,2µl
Thermocycler	Biorad	C1000
Werkbank	PEQLAB Biotechnologie GmbH	UV Sterilizing PCR Workstation,
Zentrifuge	Biosan	Combi Spin FVL-2400N

Tab. 3. 6. Geräte und Hilfsmittel für die Durchführung einer PCR

3.4.3. Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller	Beschreibung
DNA-Polymerase	Promega	GoTaq ^R DNA-Polymerase
dNTP-Mix	Roth	dNTP-Set 1; dATP, dGTP, dTTP, dCTP
Primer	Eurofins	Siehe Tab.3.8.
Reaktionspuffer	Promega	5xGreenGoTaq ^R Reaction Buffer
UHQ-Wasser		steril

Tab. 3. 7. Reagenzien und Lösungen für die Durchführung einer PCR

- **Reaktionspuffer:** Der GreenGoTaq^R Reaction Buffer enthält einen blauen und einen gelben Farbstoff. In einem 1%igen Agarosegel wandert der blaue Farbstoff mit derselben Geschwindigkeit als ein 3-5 kb großes DNA-Fragment. Der gelbe Farbstoff wandert schneller als der Primer (<50 bp). Dadurch wird die

Dichte der Probe erhöht. Folglich muss den PCR-Produkten kein Gelladepuffer vor dem Auftragen auf das Agarosegel zugesetzt werden. Des Weiteren enthält der Puffer MgCl_2 in einer Konzentration von 7,5mM, was letztens eine Konzentration von 1,5mM im Reaktionsansatz ergibt.

- **dNTP:** Für die Herstellung des dNTP-Mix' werden je 100 μl ATP/CTP/GTP/TTP mit 600 μl sterilem UHQ-Wasser gemischt.
- **Mastermix:** Der GoTaq Mastermix setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:
 - 7 546 μl UHQ-Wasser, steril
 - 2 200 μl GoTaq Green 5x Puffer
 - 220 μl dNTP-Mix
 - 44 μl GoTaq-Polymerase

Die einzelnen Komponenten werden gut miteinander gemischt, aliquotiert und tiefgekühlt gelagert.

- **Primer:** Mit folgenden Primerpaaren wurden die PCR-Läufe durchgeführt:

Name	Basensequenz	Länge [bp]	GC-Anteil [%]	Literatur
Arah3 B F	GAAGCTTACCATATAGCCCATACA	24	41,7	Scaravelli et al., 2008
Arah3 AB R	CTTGTCCTGCTCGTTCTCT	19	52,6	
SesamPr1 F	CACAGCAGGTTTACCAGAGG	20	55	Schöringhummer, Cichna-Markl, 2007
SesamPr1 R	TTATACATTTCTCGCACAAACC	22	40,9	
SesamPr2 F	TGAGGAACGTGGACGAGAG	19	57,9	Schöringhummer, Cichna-Markl, 2007
SesamPr2 R	CCCTAGCCCTCTGGTAAACC	20	60	
Ses F	CCAGAGGGCTAGGGACCTTC	20	65	Mustorp et al., 2008
Ses R	CTCGGAATTGGCATTGCTG	19	52,6	

Tab. 3. 8. Übersicht über die verwendeten Primerpaare

3.4.4. Durchführung

Alle verwendeten Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Lösungen haben steril zu sein. Gearbeitet wird in einer sterilen Werkbank und mit Arbeitshandschuhen, um Kontaminationen zu vermeiden. Während des gesamten Pipettiervorgangs werden alle

Reaktionsgefäße in Kühlblöcke gestellt, um ein frühzeitiges Reagieren der einzelnen Komponenten zu vermeiden bzw. zu reduzieren.

Für einen PCR-Ansatz werden folgende Komponenten und Volumina benötigt:

Komponente	Volumen
Mastermix	22,5µl
Primer F	1µl
Primer R	1µl
DNA-Lösung	0,5µl

Tab. 3. 9. Pipettierschema für einen PCR-Ansatz

Bei mehreren PCR-Ansätzen empfiehlt es sich einen Prämix aus Mastermix und Primern herzustellen, um Pipettierungenauigkeiten zu reduzieren. Des Weiteren ist es aufgrund von Pipettierverlusten ratsam, immer einen Ansatz mehr einzukalkulieren.

- 24,5µl Prämix in sterile PCR-Reaktionsgefäße vorlegen
- 0,5µl DNA-Lösung zugeben
- vor Gebrauch die DNA-Lösung 2 Sekunden lang vortexen, kurz zentrifugieren und sofort pipettieren
- alle Reaktionsgefäße fest verschließen, 5 Sekunden lang vortexen und anschließend zentrifugieren
- Proben in den Thermocycler stellen und mit entsprechendem Temperaturprogramm starten

Verwendet wird der Thermocycler C1000 von der Firma Biorad. Folgendes Temperaturprogramm durchlaufen die speziesspezifischen PCR-Ansätze:

Zyklusanzahl	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Time inc. [sec]
1	95	5	0
45	95	1	0
	AT	1	0
	72	1	2
1	72	8	0
1	8	unendlich	0

Tab. 3. 10. Temperaturprogramm für die speziesspezifische PCR

Nach ungefähr 3 Stunden ist ein PCR-Lauf beendet und die Proben werden entweder für die Agarosegelelektrophorese vorbereitet oder zur Lagerung tiefgekühlt.

3.5. Agarosegelelektrophorese

3.5.1. Prinzip

Elektrophoresen zählen zu den wichtigsten analytischen Methoden, da die Mehrheit der Biomoleküle Ladungen aufweisen. Bei der Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung der zu untersuchenden Substanzen sowohl nach der Ladung als auch nach der Größe der Moleküle. Man macht es sich zu Nutze, dass Nukleinsäuren bei neutralem pH-Wert als Polyanionen vorliegen, weshalb sich die Moleküle im elektrischen Feld von der Kathode zu der Anode bewegen. Um die Nukleinsäurefragmente zuordnen und ihre Größe abschätzen zu können, werden Größenstandards immer mit aufgetrennt. Agarosegele werden dann eingesetzt, wenn die zu untersuchenden Moleküle einen Durchmesser von über 10nm aufweisen, sprich wenn man große Poren benötigt. Durch die Variation der Agarosekonzentration, ergeben sich verschiedenen Trennbereiche. Somit richtet sich die Wahl der Agarosekonzentration nach den zu erwartenden Fragmentgrößen. Mit 2%igen Agarosegelen können DNA-Fragmente mit Kettenlänge zwischen 0,1 und 2 kb aufgetrennt werden [DECHERT, 2007; MATISSEK et al., 2010; NICHOLL, 2002].

3.5.2. Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Hersteller	Beschreibung
Elektrophoreseapparatur	Hoefer	HE100 supersub
Fingerschüttler	Velp Scientifica	Vortex mixer
Gelgießrahmen	Hoefer	-
Gelträgerplatte	Hoefer	20x25cm Gel
Kolbenhubpipette	Gilson	10µl
Kühlung	Pharmacia Biotech	Multi Temp III
Magnetrührer	IKA ^R -Werke	Mini MR standard
Mikrowelle	Sharp	R 207
Pipettenspitzen, steril	Biozym	10µl
Probenkämme	Hoefer	-
Stromversorgung	Pharmacia Biotech	EPS 301
Vakuumpumpe	Millipore	-
Waage	Sartorius	PT 310
Wasserbad	HGL	W16
Zentrifuge	Biosan	Combi Spin FVL-2400N

Tab. 3. 11. Geräte und Hilfsmittel für die Durchführung einer Agarosegelelektrophorese

3.5.3. Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller	Beschreibung
100 bp DNA-Ladder Lösung	Invitrogen	15628-050
Agarose	Biozym	LE Agarose
Borsäure $\geq 99,5\%$, p.a.	Roth	P010.3
Bromphenolblau	Merck	8122
EDTA	AppliChem	A1104.1000
Ficoll	Sigma-Aldrich	Typ 400
HCl, 32%, p.a.	Merck	1.00319
NaOH, 99%	Roth	9356.5
Tris	Roth	AE 15.3
UHQ-Wasser		steril
Wasser	-	vollentsalzt, steril
Xylencyanol FF	Sigma	

Tab. 3. 12. Reagenzien und Lösungen für die Durchführung einer Agarosegelelektrophorese

EDTA (0,5 M, pH 7,6/pH 8):	18,61g EDTA (Titriplex III) 2g NaOH in 80ml UHQ-Wasser lösen mit konz. NaOH auf pH 7,6/pH 8 einstellen auf 100ml im Messkolben mit UHQ-Wasser auffüllen und autoklavieren
6xGelladepuffer:	25mg Bromphenolblau (0,25 %) 25mg Xylene Cyanol (0,25 %) 1,5g Ficoll (15 %) 8,45g steriles UHQ-Wasser in ein steriles Gefäß einwiegen, durch Schütteln lösen
Tris/HCl (2 M, pH 7,6):	24,22g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in 80ml UHQ-Wasser lösen mit konz. HCl auf pH 7,6 einstellen auf 100ml im Messkolben mit UHQ-Wasser auffüllen und autoklavieren

TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6):	500µl Tris/HCl (2 M, pH 7,6) steril 200µl EDTA (0,5 M, pH 7,6) steril 100ml UHQ-Wasser, steril
100 bp DNA-Marker:	25µl 100 bp DNA-Ladder Originallösung 50µl Gelladepuffer, steril 225µl TE-Puffer, steril
5xTBE-Puffer:	270g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 137,5g Borsäure 100ml 0,5 M EDTA pH 8,0 im Messkolben auf 5 Liter auffüllen und autoklavieren
0,5xTBE-Puffer:	100ml 5xTBE-Puffer, steril 900ml steriles vollentsalztes Wasser
Agaroselösung:	4g Agarose 200ml 0,5xTBE-Puffer in Mikrowelle aufschmelzen im Wasserbad auf 50°C temperieren

3.5.4. Durchführung

Während die Agaroselösung im Wasserbad auf 50°C temperiert wird (Dauer 30 Minuten), wird die Gelgießvorrichtung vorbereitet:

- alle Teile der Gelgießvorrichtung mit Ethanol (vergällt) gut entfetten
- Ränder der Gelträgerplatte mit Scotch-Tape verschließen um ein Auslaufen des Gels zu verhindern
- Gelgießrahmen auf einer waagrechten Fläche platzieren und Gelträgerplatte hineinstellen
- Temperierte Agaroselösung auf die Trägerplatte luftblasenfrei gießen
- Probenkämme sofort einsetzen

- 1 Stunde aushärten lassen und anschließend Klebeband entfernen

In der Zwischenzeit wird die Elektrophoreseapparatur startklar gemacht:

- Wasser mittels Vakuumpumpe absaugen
- Apparatur mit 955ml 0,5xTBE-Puffer füllen
- Kühlung einschalten
- Kämme entfernen und Agarosegel luftblasenfrei in die Apparatur setzen

Anschließend können die aufgetauten PCR-Produkte und der Marker aufgetragen werden. Da das Enzym GoTaq verwendet wird müssen die PCR-Produkte nicht mit Gelladepuffer versetzt werden:

- Auftragsmenge PCR-Produkte: 10µl
- Auftragsmenge Marker: 5µl

Wenn alle Proben aufgetragen sind, wird eine Spannung (150 Volt) angelegt. Nach rund 15 Minuten wird der Magnetrührer zur Umwälzung des TBE-Puffers eingeschaltet. Nach 3 Stunden ist der Lauf beendet. Das Gel wird herausgenommen, der Puffer abgesaugt und das Gel gefärbt.

3.6. Färben, Entfärben und Fotografieren der Gele

3.6.1. Prinzip

Für die Detektion von DNA-Proben wird häufig die Ethidiumbromidfärbung eingesetzt. Das Ethidiumbromid, eine stark mutagene Substanz, lagert sich zwischen den Basen der DNA ein und nach Anregung durch UV-Licht erscheint der Ethidiumbromid-DNA Komplex als rot-orange leuchtende Banden im sichtbaren Bereich. Je nach DNA-Fragmentgröße, können bei Agarosegelen mindestens 2-5ng DNA detektiert werden [DECHERT, 2007].

3.6.2. Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Hersteller	Beschreibung
Entfärbewanne	-	-
Entgiftungssäule	Elchrom Scientific	Bind-ET™ Cartridge for Ethidium Removal System
Färbewanne	-	-
Handschuhe	Top Clove	Nitril, puderfrei, blau
Kamera	Kodak	Gel Documentation System
Kolbenhubpipette	Socorex	50µl
Messer	-	-
Messzylinder	Duran	1000ml
PC-Software	Shanghai Biotech	GeneScope V1.73
Pipettenspitzen	Sarstedt	200µl, gelb

Tab. 3. 13. Geräte und Hilfsmittel zum Färben und Fotografieren der Gele

3.6.3. Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller	Beschreibung
Ethidiumbromid	Roth	1%ig (10mg/ml)
TBE-Puffer	-	gebraucht
Wasser	-	vollentsalzt, steril

Tab. 3. 14. Reagenzien und Lösungen zum Färben und Fotografieren der Gele

Färbelösung: 700µl steriles vollentsalztes Wasser
 70µl Ethidiumbromid

Entfärbelösung: gebrauchter 0,5xTBE-Puffer

3.6.4. Durchführung

Das Färben, Entfärben und Fotografieren erfolgt aufgrund der toxischen und kanzerogenen Eigenschaften von Ethidiumbromid in einem eigenen Raum. Es müssen Schutzkleidung und Nitrilhandschuhe getragen werden, und kein mit Ethidiumbromid kontaminierter Gegenstand darf diesen Raum verlassen.

- Färbewanne mit Färbelösung vorbereiten
- Gel vorsichtig von der Gelträgerplatte herunter lösen
- 1 Stunde lang färben
- Gel für 30 Minuten in die Entfärbelösung legen

- Schneiden
- Fotografieren
 - Kamera und Computer einschalten und Software „Kodak“ öffnen
 - Gel luftblasenfrei auf den UV-Transilluminator legen
 - UV-Licht einschalten
 - Gel bei verschiedenen Belichtungszeiten (zwischen 0,8 und 1,1 Sekunden) fotografieren
 - Fotos abspeichern
- Gel entsorgen
- Färbe- und Entfärbelösung über Säule entgiften

3.7. Real-time PCR

3.7.1. Prinzip

Im Gegensatz zu der Endpunkt-PCR besteht bei der Technik der Real-time PCR die Möglichkeit, Amplifikation und Detektion in einem Lauf zu kombinieren. Bei der Real-Time PCR wird die Menge der DNA nach jedem Zyklus mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern, die in das PCR-Produkt eingebaut werden, gemessen. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals ist direkt proportional zur Anzahl der PCR-Produkte.

3.7.2. Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Hersteller	Beschreibung
Computer	-	-
Fingerschüttler	Velp Scientifica	Vortex mixer
Kolbenhubpipetten	Gilson	diverse
Kühlblock	-	-
Pipettenspitzen	Biozym	diverse, steril
Reaktionsgefäße	Biozym	High und low profile strips; 1,5ml, flat cap, domed cap
Thermocycler mit Optik	Biorad	CFX96 und IQ5
Werkbank, steril	PEQLAB Biotechnologie GmbH	UV Sterilizing PCR Workstation
Zentrifuge	VWR	Galaxy Mini

Tab. 3. 15. Geräte und Hilfsmittel für die Durchführung einer Real-time PCR

3.7.3. Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller	Beschreibung
AE-Puffer	Qiagen	DNeasy ^R Blood & Tissue Kit (50)
Primer	Eurofins	Siehe Tab.3.8
Supermix	Biorad	iQ TM SYBR ^R Green Supermix
UHQ-Wasser	-	steril

Tab. 3. 16. Reagenzien und Lösungen für die Durchführung einer Real-time PCR

- **Supermix:** Der Supermix beinhaltet einen Reaktionspuffer mit dNTPs, hot-start iTaqTM DNA-Polymerase, 6 mM MgCl₂, SYBR Green I, Fluoreszein und Stabilisatoren.
- **Primer:** Es werden für die Real-time PCR dieselben Primerpaare wie für die speziesspezifische PCR verwendet (siehe Tabelle 3.8.).

3.7.4. Durchführung

Wie bei der PCR, wird auch bei der Real-time PCR in einer sterilen Werkbank, mit Handschuhen und mit sterilen Reaktionsgefäßen und sterilen Lösungen gearbeitet, um Kontaminationen zu vermeiden. Des Weiteren werden alle Reaktionsgefäße und verwendete Lösungen während des ganzen Pipettiervorgangs in Kühlblöcken temperiert.

Gearbeitet wird mit einer Standardreihe der jeweiligen Probe, daher muss zuerst eine entsprechende Verdünnungsreihe hergestellt werden:

Name	Pipettierschema	Verdünnung
Standard 1 = 100%	90 µl AE-Puffer + 10 µl 100 %ige DNA	1:10
Standard 2 = 10%	90 µl AE-Puffer + 10 µl der 1:10 Verdg.	1:100
Standard 3 = 1%	90 µl AE-Puffer + 10 µl der 1:100 Verdg.	1:1 000
Standard 4 = 0,1%	90 µl AE-Puffer + 10 µl der 1:1 000 Verdg.	1:10 000
Standard 5 = 0,01%	90 µl AE-Puffer + 10 µl der 1:10 000 Verdg.	1:100 000

Tab. 3. 17. Pipettierschema für die Standardreihe

Da für einen Real-time PCR-Ansatz 5µl DNA-Lösung benötigt werden, also die 10fache Menge, wie für einen speziesspezifischen PCR-Ansatz (0,5µl), wird die Ausgangs-DNA-Lösung 1:10 verdünnt, um die gleiche DNA-Konzentration zu erhalten. Standard 1 ist

somit keine echte Verdünnungsstufe und stellt die 100%ige Ausgangs-DNA-Lösung für einen Real-time PCR-Ansatz dar. Für einen Real-time PCR-Ansatz werden folgende Komponenten und Volumina benötigt:

Komponente	Volumen
Supermix	12,5µl
UHQ-Wasser, steril	5,5µl
Primer F	1µl
Primer R	1µl
DNA-Lösung	5µl

Tab. 3. 18. Pipettierschema für einen Real-time PCR-Ansatz

Bei mehreren Real-time PCR-Ansätzen empfiehlt es sich einen Prämix aus Supermix, UHQ-Wasser und Primern herzustellen, um Pipettierungenauigkeiten zu reduzieren. Des Weiteren ist es aufgrund von Pipettierverlusten ratsam, immer einen Ansatz mehr einzukalkulieren. Alle Standards werden im Dreifachansatz analysiert, nur für Standard 1 und NTC genügt ein Doppelansatz.

- 20µl Prämix in sterile Reaktionsgefäße vorlegen
 - für CFX96 low-profile strips verwenden
 - für IQ5 high-profile strips verwenden
- 5µl DNA-Lösung zugeben
- DNA-Lösungen vor Gebrauch kurz 2 Sekunden vortexen, zentrifugieren und sofort pipettieren
- Reaktionsgefäße gut verschließen (Dabei ist es wichtig den Deckel mittig nicht zu berühren, da es ansonsten die Fluoreszenzmessung beeinträchtigt)
- kurz klopfen (zum mischen) und zentrifugieren
- Proben in den Real-time Thermocycler stellen und mit dem entsprechenden Temperatur/Zeitprogramm starten

Verwendet werden die Geräte CFX96 und IQ5 von der Firma Biorad.

Es wurden verschiedene Temperatur/Zeitprogramme auf beiden Geräten ausgetestet. Grundsätzlich gibt es die Möglichkeit ein dreistufiges Programm, mit einer eigenen

Elongationsphase, zu verwenden oder ein zweistufiges Programm, ohne einer eigenen Elongationsphase. Des Weiteren können die Annealingzeiten variiert werden.

Zyklusanzahl	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Fluoreszenzmessung
1	95	180	-
45	95	10/15	-
	AT	10/20/30/40/60/80	Plate Read
	72	20	Plate Read
1	95	20	-
1	AT	30	-
Schmelzkurvenanalyse: Temperaturerhöhung in 0,5°C Abständen für 10 sec von AT bis 95°C und jeweils Fluoreszenzmessung			

Tab. 3. 19. Dreistufiges Temperatur/Zeitprogramm

Zyklusanzahl	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Fluoreszenzmessung
1	95	180	-
45	95	10/15	-
	AT	10/20/30/40/60/80	Plate Read
	95	20	-
1	AT	30	-
Schmelzkurvenanalyse: Temperaturerhöhung in 0,5°C Abständen für 10 sec von AT bis 95°C und jeweils Fluoreszenzmessung			

Tab. 3. 20. Zweistufiges Temperatur/Zeitprogramm

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. DNA-Konzentrationsbestimmung

4.1.1. Aus Erdnuss isolierte DNA

Nach Isolierung der DNA aus geriebenen Erdnüssen wurde die DNA-Konzentration mittels Fotometer ermittelt. Folgende Werte wurden erhalten:

	O _D 260 [nm]	O _D 280 [nm]	c [µg/ml]	O _D 260/ O _D 280
Probe 1 (1:100)	0,091	0,071	455	1,3
Probe 2 (1:200)	0,039	0,020	390	1,9

Tab. 4. 1. Ergebnisse der DNA-Konzentrationsbestimmung von Erdnuss

Obwohl beide Erdnussproben demselben Ausgangsmaterial entnommen wurden, liegen die Werte ihrer DNA-Konzentrationen 65 µg/ml auseinander. Auch die Reinheitsquotienten weichen deutlich voneinander ab. Der mit 1,3 viel zu niedere Wert von Probe 1 deutet auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, daher empfiehlt es sich, für weitere Untersuchungen Probe 2 zu verwenden, da ihr Quotient von 1,9 in den Idealbereich für reine DNA, der zwischen 1,8 und 2 liegt [STASSEN, 2007], fällt.

4.1.2. Aus Sesam isolierte DNA

Nach Isolierung der DNA aus geriebenen Sesamsamen wurde die DNA-Konzentration mittels Fotometer ermittelt. Folgende Werte wurden erhalten:

	O _D 260 [nm]	O _D 280 [nm]	c [µg/ml]	O _D 260/ O _D 280
Probe 1 (1:100)	0,040	0,022	200	1,8
Probe 2 (1:10)	0,354	0,194	177	1,8
Probe 3 (1:100)	0,055	0,030	275	1,8

Tab. 4. 2. Ergebnisse der DNA-Konzentrationsbestimmung von Sesam

Alle Sesamproben wurden demselben Ausgangsmaterial entnommen und weisen dennoch starke Schwankungen in der DNA-Konzentration auf, was für quantitative Nachweise zu berücksichtigen ist. Aufgrund des idealen Reinheitsquotienten von 1,8, der bei allen drei Proben ermittelt werden konnte, ist davon auszugehen, dass die

isolierte DNA in reiner Form vorliegt und die weiteren Versuche nicht durch mitisolierte, störende Komponenten beeinflusst werden.

4.2. Speziesspezifische PCR – Gelelektrophorese

Mittels speziesspezifischer PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese soll ein Überblick über die Spezifität der Primer gewonnen werden. Auch soll ein mögliches Risiko für die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte abgeschätzt werden können. Des Weiteren ist es erforderlich, die optimalen Annealingtemperaturen für die jeweiligen Primer auszutesten. Die Ergebnisse dieser „Vorversuche“ dienen als Hilfestellung für die anschließend durchgeführte Real-time PCR.

4.2.1. Nachweis des Erdnuss-Allergens *Ara h 3*

Das Erdnuss-Allergen *Ara h 3* soll mit dem spezifischen Primerpaar Arah3AF/Arah3ABR [SCARAVELLI et al., 2008] nachgewiesen werden. Laut Scaravelli et al. (2008) liegt die optimale Annealingtemperatur dieses Primerpaars bei 60°C und ein 105 bp großes Amplikon wird gebildet.

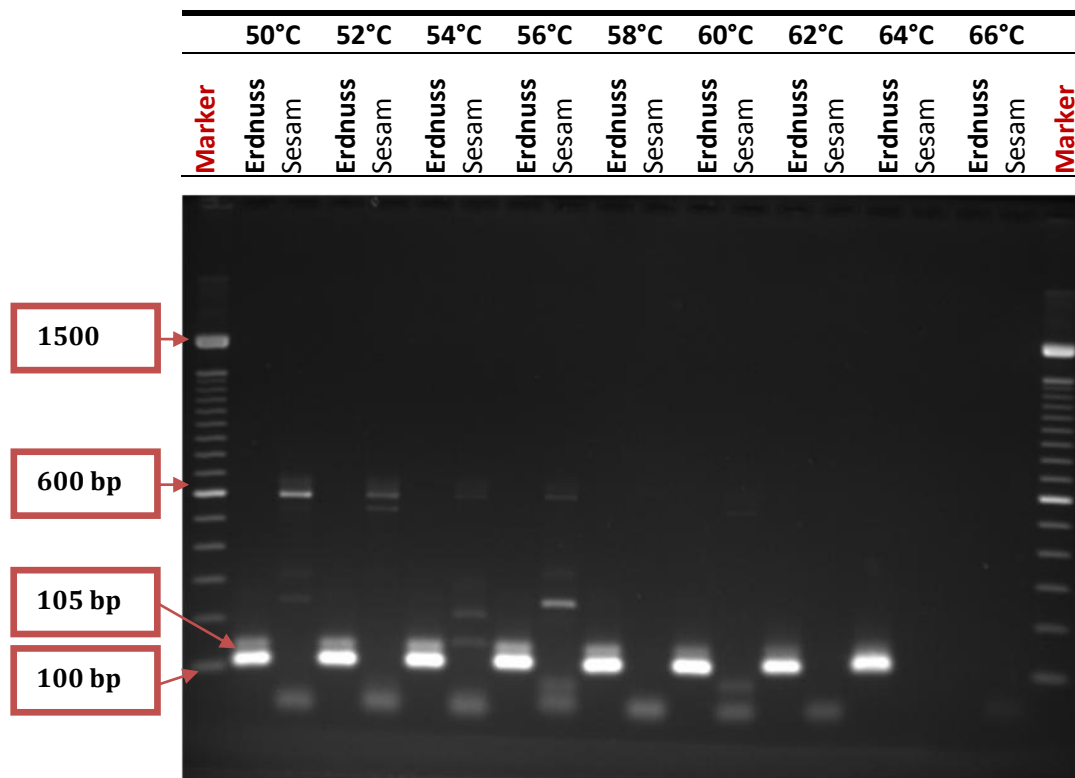


Abb. 4. 1. Erdnuss-spezifische PCR mit Primer Arah3AF/Arah3ABR (50°C-66°C)

Abbildung 4.1. zeigt das Verhalten des für *Ara h 3* spezifischen Primerpaars Arah3AF/Arah3ABR bei verschiedenen Annealingtemperaturen. Ausgehend von 60°C wurde die Annealingtemperatur in zwei Grad Schritten erhöht und gesenkt, um sowohl die maximale Temperatur festzulegen als auch das Verhalten der Primer bei niederen Temperaturen zu beobachten. Als Negativkontrolle wurde parallel zur Erdnuss Sesam analysiert.

Wie zu erwarten, können mit Hilfe des mitaufgetrennten Markers spezifische Amplifikationsbanden der Erdnuss im Bereich von 105 bp identifiziert werden. Betrachtet man die Banden bei unterschiedlichen Temperaturen, so ist deutlich zu sehen, dass bei 66°C kein spezifisches Amplikon mehr gebildet werden kann, da die Annealingtemperatur zu hoch ist. Des Weiteren ist ersichtlich, dass bei den niedrigeren Annealingtemperaturen vermehrt unspezifische Produkte in der Negativkontrolle amplifiziert werden. Sesam zeigt im Bereich von 600 bp deutliche Banden, wobei diese Amplifikationsprodukte grundsätzlich unbedeutend sind, solange sie eindeutig als unspezifisch eingestuft werden können.

In der Regel tendiert man dazu die Annealingtemperatur zu maximieren um unspezifische Produktbildungen zu vermeiden [BANGSOW et al., 2007]. Daher empfiehlt es sich in diesem Fall die optimale Annealingtemperatur bei 62°C festzulegen. Bei dieser Temperatur werden keine unspezifischen Produkte mehr gebildet, ein Sicherheitsabstand zur maximalen Temperatur ist gegeben und die Intensität der spezifischen Amplifikationsbande ist nicht beeinträchtigt.

Die Abweichung von der Literatur hinsichtlich der optimalen Annealingtemperatur ist dadurch zu erklären, dass Scaravelli et al. (2008) andere Konzentrationen der Reagenzien verwendet haben und die PCR ein anderes Temperatur/Zeitprogramm durchlaufen ist. Aufgrund dieser veränderten Reaktionsbedingungen lassen sich die Ergebnisse nicht mehr miteinander vergleichen.

4.2.2. Nachweis des Sesam-Allergens *Ses i 1*

Der Nachweis des Sesamallergens *Ses i 1* wurde mit drei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt, die zwar alle für *Ses i 1* spezifisch sind, aber mit unterschiedlichen Sequenzen hybridisieren.

4.2.2.1. Primerpaar SesamPr1F/SesamPr1R

Das Primerpaar SesamPr1F/SesamPr1R weist eine sehr hohe Spezifität für Sesam auf und bildet ein 143 bp großes Amplikon [SCHÖRINGHUMER und CICHNA-MARKL, 2007].

Da Schöringhumer und Cichna-Markl (2007) für die speziesspezifische PCR keine optimale Annealingtemperatur angegeben haben, wurde das Temperaturoptimum für die Real-time PCR – 56°C – als Ausgangspunkt herangezogen. Die Annealingtemperatur wurde in 2°C Abstände erhöht und gesenkt, um das Verhalten der Primer zu beobachten. Als Negativkontrollen wurden 14 adere pflanzliche Proben parallel zu Sesam aufgetragen.

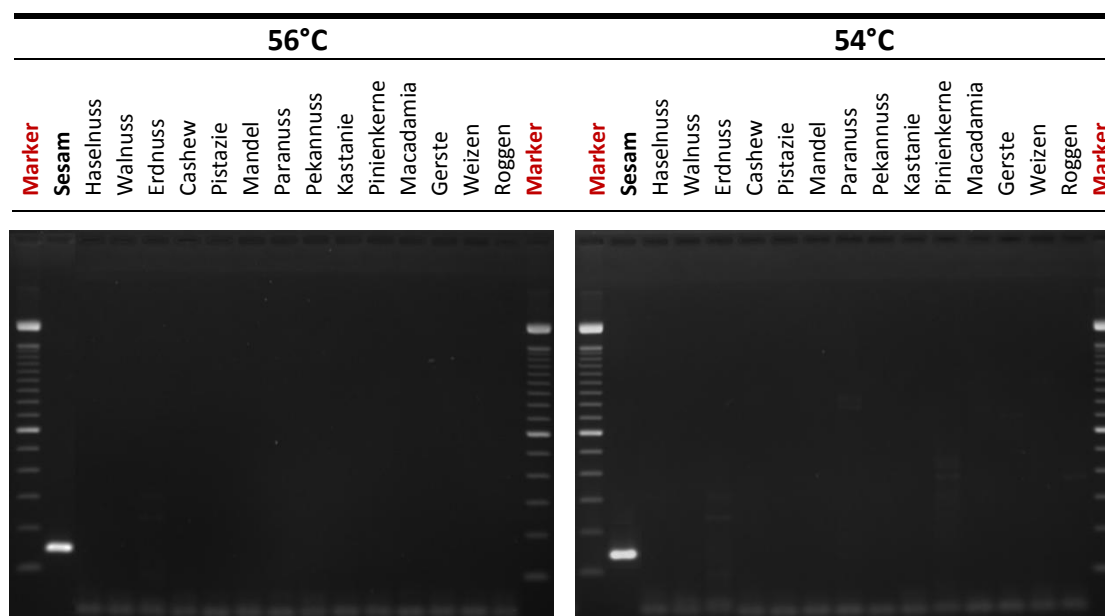


Abb. 4. 3. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr1F/SesamPr1R (56°C)

Abb. 4. 2. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr1F/SesamPr1R (54°C)

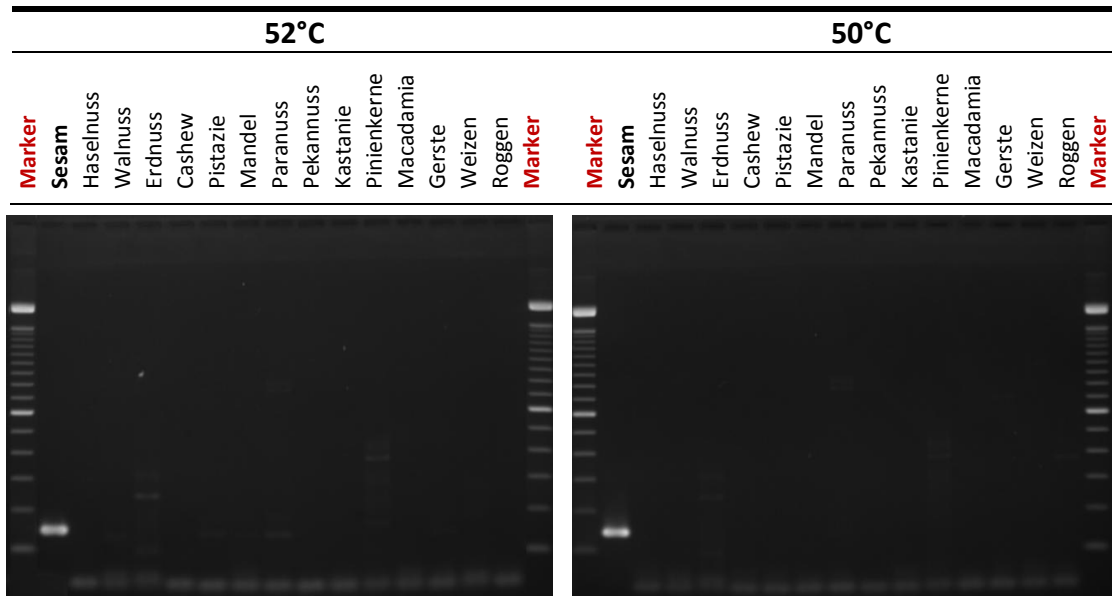


Abb. 4. 4. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr1F/SesamPr1R (52°C)

Abb. 4. 5. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr1F/SesamPr1R (50°C)

Bei diesen vier Abbildungen kann das Sesamamplikon im Bereich von 143 bp ohne Schwierigkeiten identifiziert werden. Es werden keine falsch, positiven Amplikone gebildet, lediglich die Erdnuss zeigt ganz schwache, unspezifische Banden.

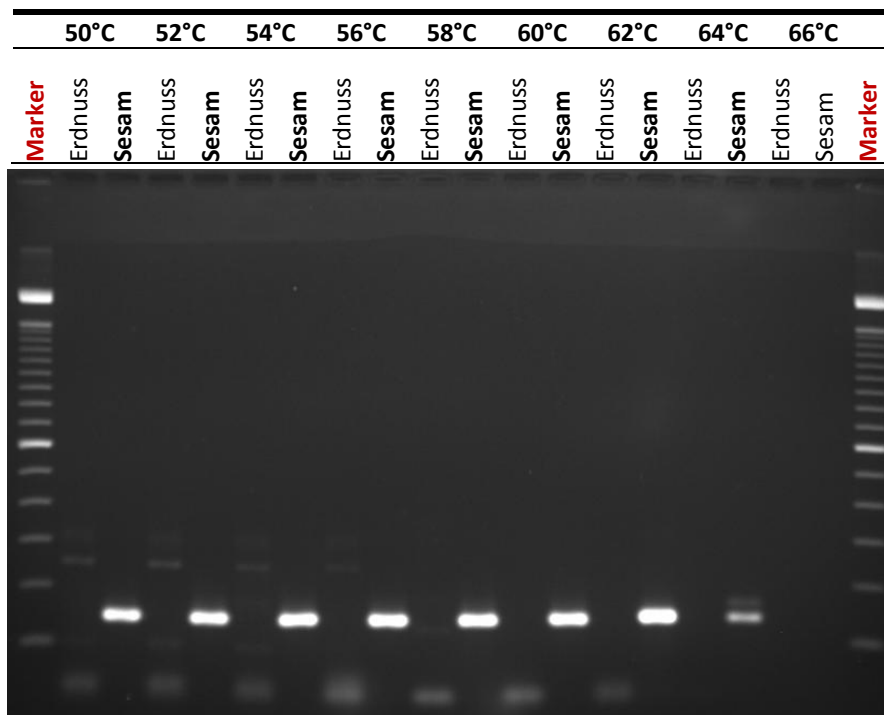


Abb. 4. 6. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr1F/SesamPr1R (50°C-66°C)

Abbildung 4.6. gibt einen Überblick über die ausgetesteten Annealingtemperaturen mit SesamPr1F/SesamPr1R. Bei 64°C ist die Intensität des Sesamamplikons deutlich schwächer, woraus zu schließen ist, dass bei dieser Temperatur die Reaktionsbedingungen nicht mehr optimal sind und das Temperaturmaximum erreicht ist. Folglich erscheinen bei weiteren Temperaturerhöhungen keine Banden mehr.

Gut lässt sich weiter erkennen, dass die Erdnuss bei niedrigeren Annealingtemperaturen (bei 50°C bis 56°C) ebenfalls ein Amplikon bildet und das bei jedem Lauf, sodass davon auszugehen ist, dass es sich um keinen Zufallstreffer handelt. Da es aber deutlich von der spezifischen Sesambande zu unterscheiden ist, stellt es kein Problem dar. Eine Erklärung, warum bei einem Sesam-spezifischen Primer bei der Erdnuss Banden auftreten, könnte das Phänomen der Homologie liefern. Es ist bekannt, dass das Sesam-Allergen *Ses i 2* zu 34 % homolog dem Erdnuss-Allergen *Ara h 2* ist. *Ses i 2* wiederum ist zu 47 % homolog zu *Ses i 1* [BEYER et al., 2002].

Die Ergebnisse zusammengefasst: SesamPr1F/SesamPr1R ist ein sehr spezifisches Primerpaar für das Sesam-Allergen *Ses i 1*. Es kommt selbst bei niedrigen Annealingtemperaturen wie 50°C zu keiner Amplifikation des Sesam-spezifischen PCR-Produkts in anderen pflanzlichen Proben und auch die Amplifikation unspezifischen Produkte ist überschaubar. Da grundsätzlich aber die Annealingtemperatur so hoch wie möglich festgelegt werden sollte [BANGSOW et al., 2007], empfiehlt es sich für das Primerpaar SesamPr1F/SesamPr1R Temperaturen von 60°C bis 62°C zu verwenden.

4.2.2.2. Primerpaar SesamPr2F/SesamPr2R

Das Primerpaar SesamPr2F/SesamPr2R ist ebenfalls für das Allergen *Ses i 1* spezifisch und bildet ein Amplikon von 117 bp. Als ein Anhaltspunkt für die optimale Annealingtemperatur kann 58°C herangezogen werden [SCHÖRINGHUMER und CICHNA-MARKL, 2007].

Die Vorgehensweise ist gleich wie bei den anderen Primerpaaren. Es gilt wieder die optimale Annealingtemperatur und die Spezifität von SesamPr2F/SesamPr2R festzustellen.

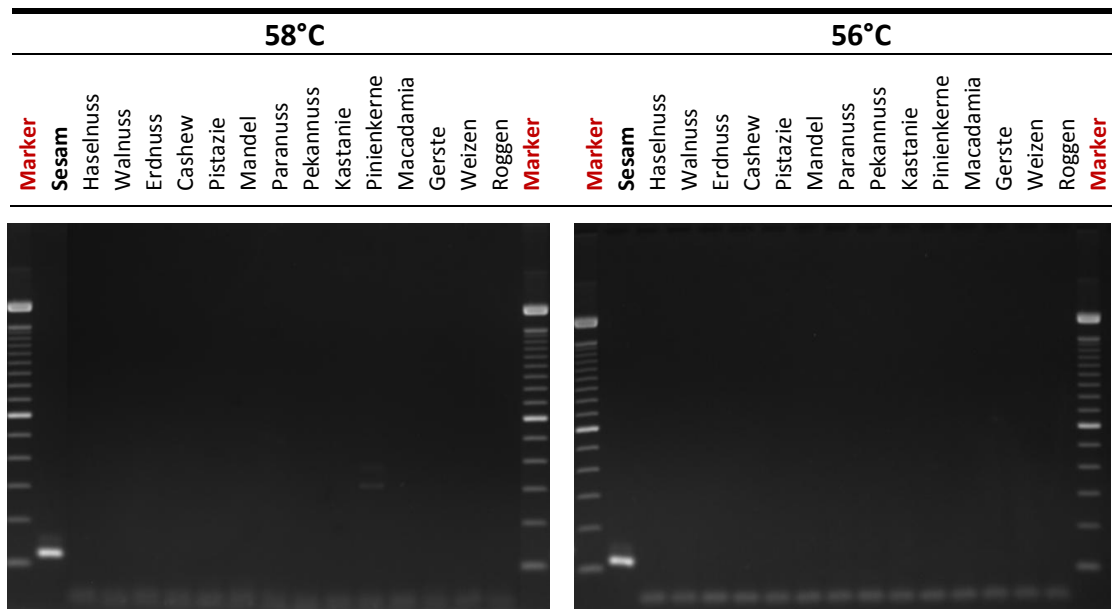


Abb. 4. 7. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr2F/SesamPr2R (58°C)

Abb. 4. 8. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr2F/SesamPr2R (56°C)

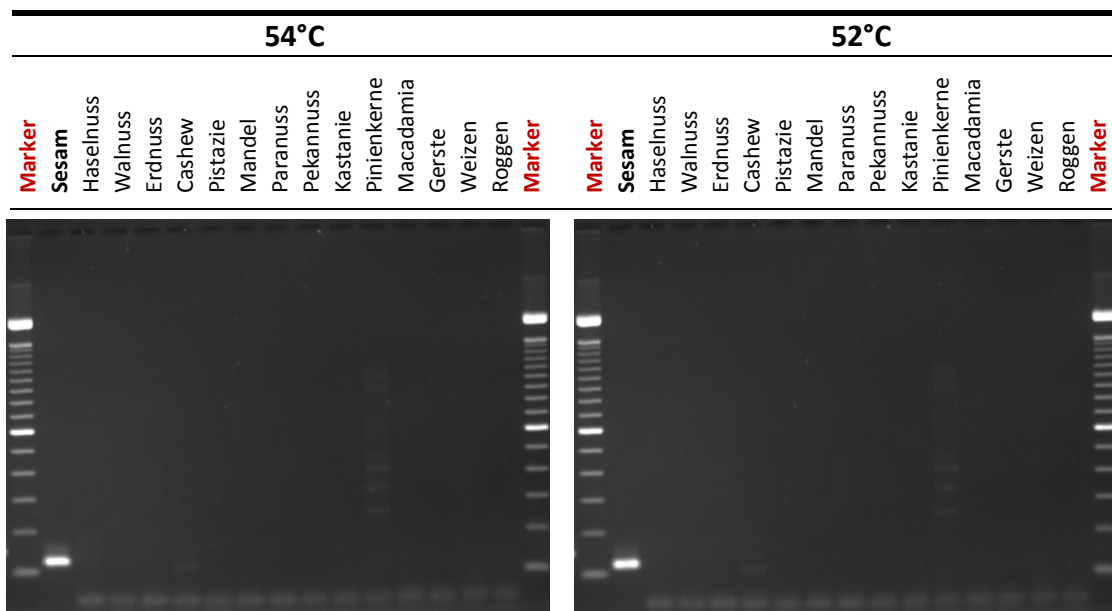


Abb. 4. 10. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr2F/SesamPr2R (54°C)

Abb. 4. 9. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr2F/SesamPr2R (52°C)

Bei allen vier Abbildungen ist das spezifische Sesamamplikon im Bereich von 117 bp deutlich zu erkennen. Die Intensität der Banden nimmt mit sinkenden Annealingtemperaturen zu. Bei 52°C und 54°C sind unspezifische Banden bei den Pinienkernen sichtbar und bei den Cashewnüssen wird scheinbar ein PCR-Produkt von

ähnlicher Größe wie das Sesamamplikon gebildet. Folglich wird mit solch niedrigen Annealingtemperaturen nicht gearbeitet.

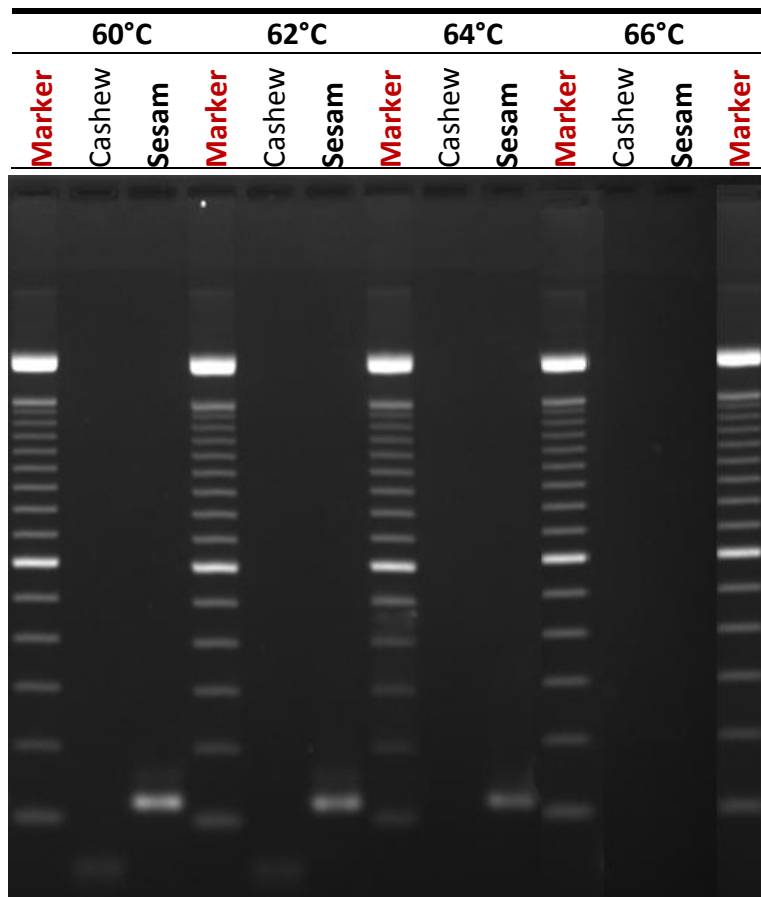


Abb. 4. 11. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesamPr2F/
SesamPr2R (60°C-66°C)

Wird die Annealingtemperatur kontinuierlich erhöht, ist schön zu erkennen, dass die Intensität der Sesamamplikone mit dem Temperaturanstieg immer schwächer wird, bis letztlich keine Banden mehr sichtbar sind.

Auch in diesem Fall gilt wieder der Grundsatz die höchstmögliche Annealingtemperatur zu verwenden [BANGSOW et al., 2007]. Vergleicht man die unterschiedlichen Temperaturen so ist ersichtlich, dass die optimale Annealingtemperatur für das Primerpaar SesamPr2F/SesamPr2R bei 58°C liegt. Bei dieser Temperatur werden keine falsch positiven Banden sichtbar, keine unspezifischen PCR-Produkte gebildet und keine Intensitätsabnahme der Sesambande verzeichnet.

4.2.2.3. Primerpaar SesF/SesR

Das Primerpaar SesF/SesR bildet ein 64 bp großes Sesam-spezifisches Amplikon von starker Intensität über einen Annealingtemperaturbereich von 50°C bis 70°C und ab 55°C treten keine unspezifischen Amplifikationsprodukte mehr auf [MUSTORP et al., 2008].

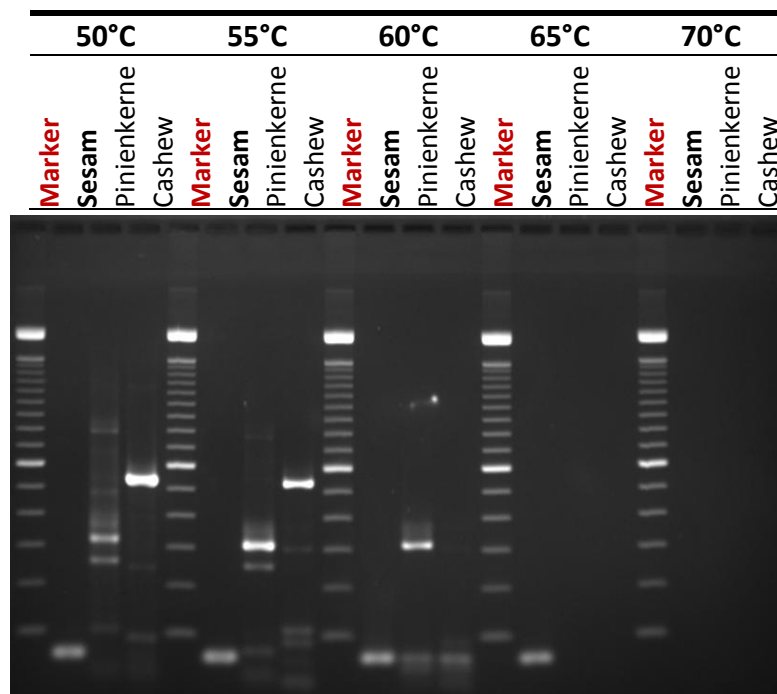


Abb. 4. 12. Sesam-spezifische PCR mit Primer SesF/SesR (50°C-70°C)

Abbildung 4.12. gibt einen Überblick, wie sich das Primerpaar SesF/SesR über den in der Literatur publizierten Temperaturbereich verhält. Deutlich ist zu erkennen, dass dieses Primerpaar bei Weitem nicht so Sesam-spezifisch agiert wie die bereits diskutierten Primer. Das Sesam-spezifische Amplikon von 64 bp ist zwar zu erkennen, aber die Bildung von unspezifischen PCR-Produkten ist enorm und vor allem jene in der Größenordnung von 64 bp sind problematisch, daher dürfen die Temperaturen von 60°C und abwärts auf keinen Fall verwendet werden. Da bei 65°C keine falsch-positiven Produkte mehr entstehen, liegt die Vermutung nahe, dass die optimale Annealingtemperatur zwischen 60°C und 65°C zu finden ist.

von Mustorp et al. (2008) abweichen, ist nicht verwunderlich, da andere Reaktionsbedingungen vorlagen.

4.3. Real-time PCR

Mittels Real-time PCR soll die Spezifität der Primer bestätigt und ihre Sensitivität ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden Verdünnungsreihen in 10er Potenzschritten mit dem jeweils zu untersuchenden Allergen hergestellt, mit der Real-time PCR amplifiziert und mit Hilfe von SYBR Green detektiert.

Ein weiteres Ziel ist es, die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Für diesen Zweck wurden unterschiedliche Temperatur/Zeitprogramme an zwei verschiedenen Real-time Thermocyclern (IQ5 und CFX96; beide von BIORAD) getestet und verschiedene Reaktionsgefäße verwendet.

4.3.1. Nachweis des Erdnuss-Allergens *Ara h 3*

Von der isolierten Erdnuss-DNA (195 ng/μl) wurden vier Verdünnungen von 1:10 bis 1:10000 hergestellt, was Konzentrationen bis 19,5 pg/μl (= Standard 5; 0,01%) Erdnuss-DNA entspricht, und die Reaktionsansätze nach entsprechendem Pipettierschema (siehe Material und Methoden 3.7.4; Seite 53) vorbereitet. Es wurde dasselbe Primerpaar Arah3BF/Arah3ABR wie für die PCR-Agarosegelelektrophorese verwendet. Die mit deren Hilfe ermittelte, optimale Annealingtemperatur plus 3°C wird als Ausgangswert für die Real-time PCR herangezogen.

- **Temperaturversuch mit dreistufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5**

Bei diesem Versuch soll die optimale Annealingtemperatur für das Primerpaar Arah3AF/Arah3ABR ermittelt werden. Ausgehend von 65°C wurde die Annealingtemperatur in 2°C Abstände erhöht und gesenkt. Dreistufiges Temperatur/Zeitprotokoll bedeutet 15s Denaturierungsphase bei 95°C, 40s

Annealingphase bei entsprechender Annealingtemperatur und 20s Elongationsphase bei 72°C.

Bei allen nachfolgenden Abbildungen stellen die **roten** Kurven Standard 1 (100%), die **orangen** Standard 2 (10%), die **türkisen** Standard 3 (1%), die **grünen** Standard 4 (0,1%), die **blauen** Standard 5 (0,01%) und die schwarzen Kurven die NTC dar. Der Threshold wurde einheitlich bei 5 festgelegt, um die C_t -Werte miteinander vergleichen zu können.

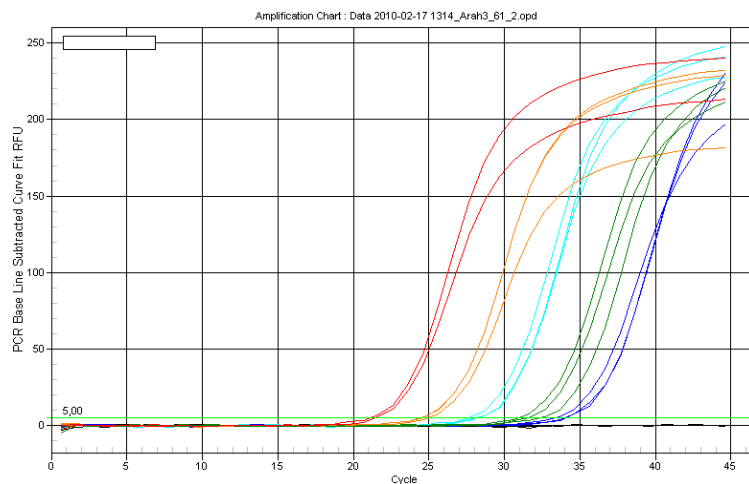


Abb. 4. 17. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 61°C mit 3stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

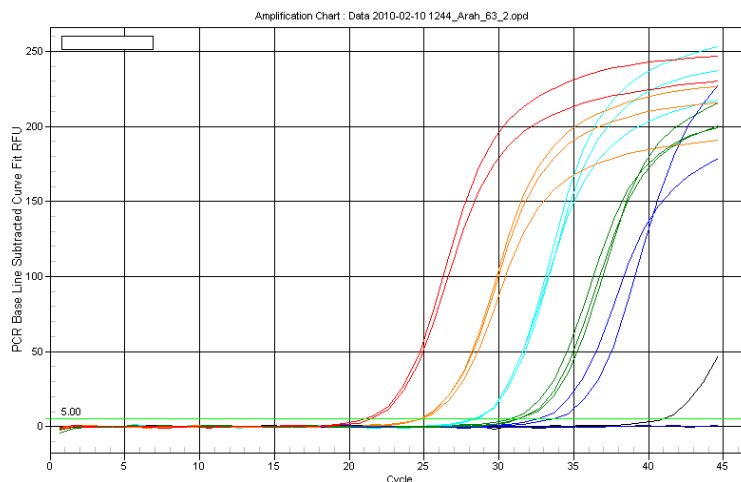


Abb. 4. 18. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C mit 3stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

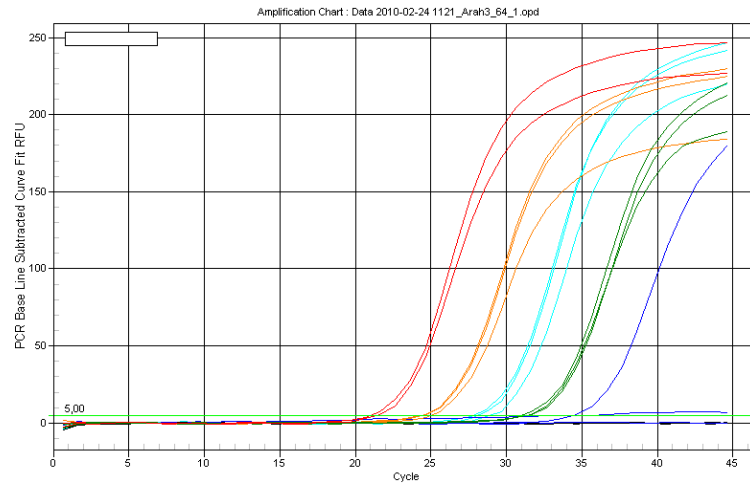


Abb. 4. 19. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C mit 3stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

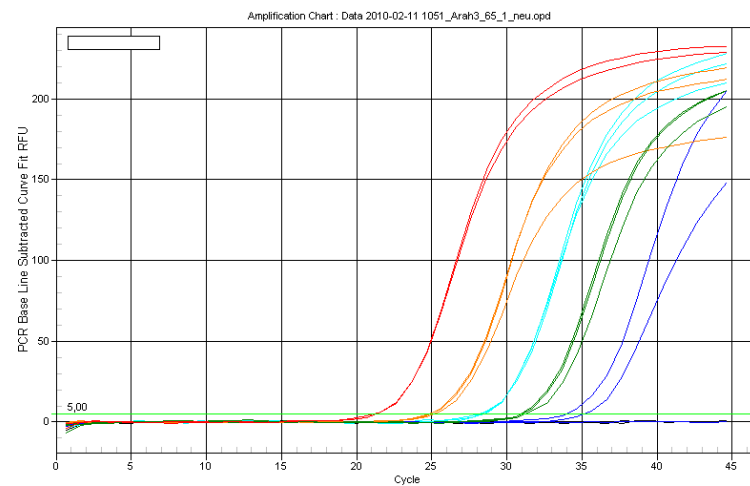


Abb. 4. 20. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 65°C mit 3stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

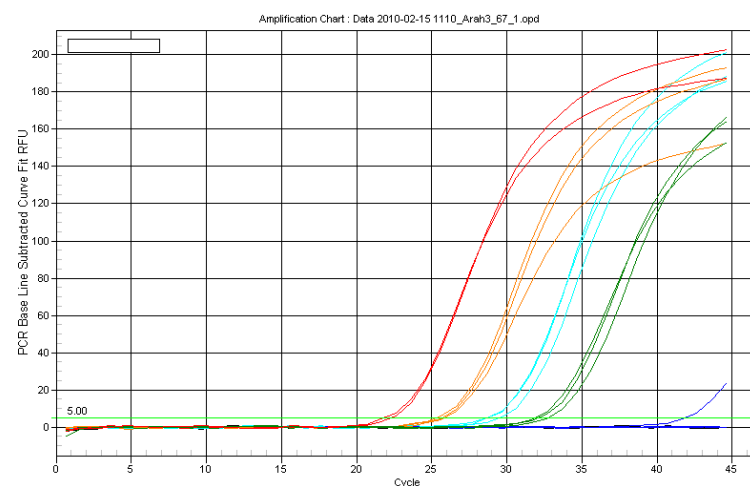


Abb. 4. 21. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 67°C mit 3stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

Um zu beweisen, dass es sich bei den Amplifikaten tatsächlich nur um Sesam-DNA handelt, wurde nach dem letzten Zyklus bei jedem Versuch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

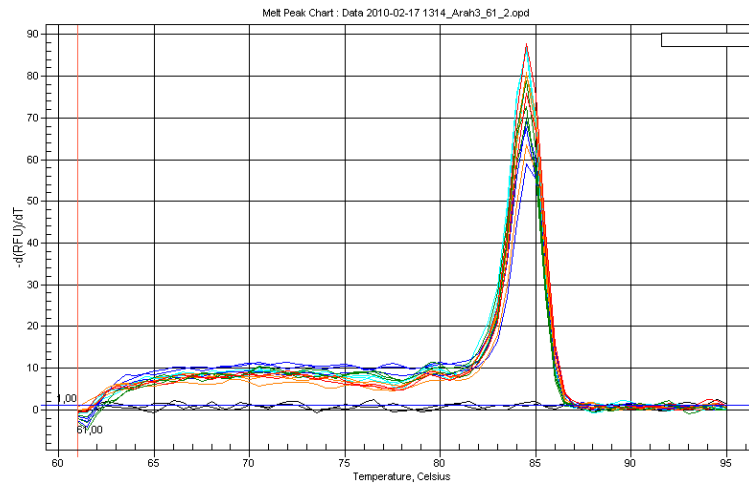


Abb. 4. 22. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 61°C; 3stufig)

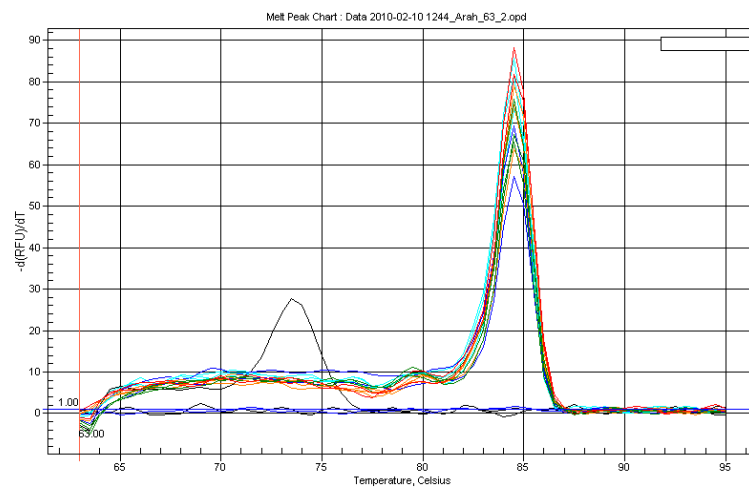


Abb. 4. 23. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 63°C; 3stufig)

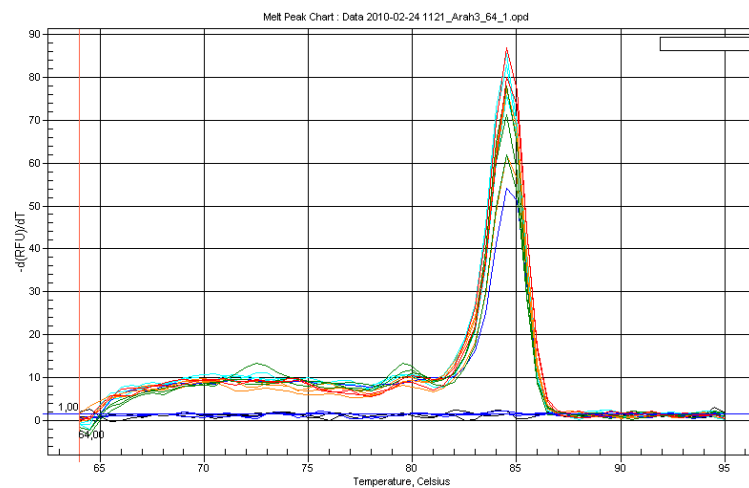


Abb. 4. 24. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 64°C; 3stufig)

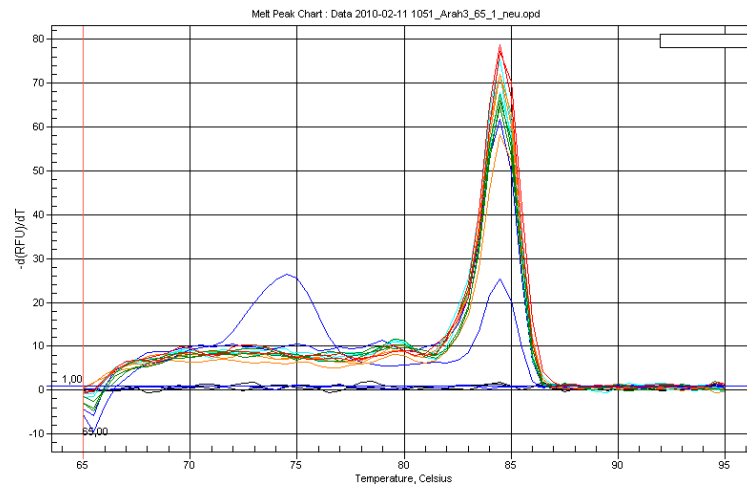


Abb. 4. 25. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 65°C; 3stufig)

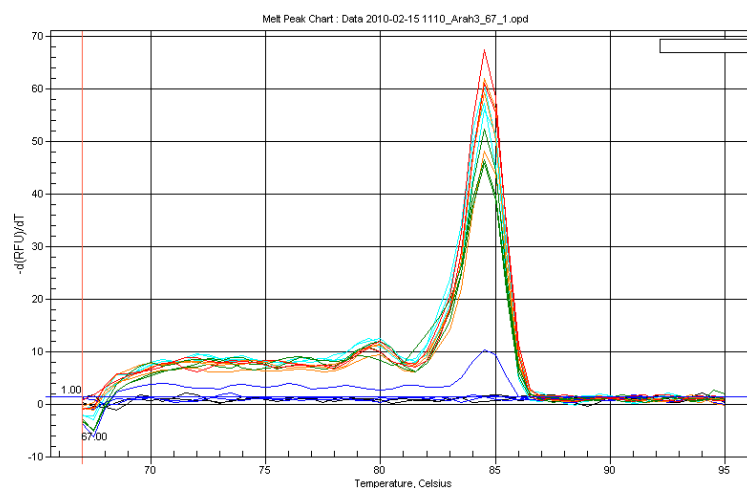


Abb. 4. 26. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 67°C; 3stufig)

Bei einer 10fachen Verdünnungsreihe sollten im Idealfall einer exponentiellen Verdoppelung die C_t -Werte der einzelnen Verdünnungsstufen 3,32 Zyklen auseinander liegen [BIORAD, 2006].

Ein Vergleich der Amplifikationskurven bei verschiedenen Annealingtemperaturen zeigt, dass dieser Wert von den Verdünnungen 100% bis 0,1% bei allen Temperaturen ungefähr eingehalten werden kann. Ausschlaggebend ist die höchste Verdünnungsstufe 0,01%. Diese verhält sich nur bei 64°C und 65°C annähernd ideal. Bei 63°C und 61°C erscheinen die Amplifikationskurven von 0,01% zu nah bei jenen von 0,1% und bei 67°C erheben sie sich rund neun Zyklen zu spät. Auch ist bei 67°C bereits eine leichte Erhöhung der C_t -Werte bei der 100%igen Probe zu erkennen, was bestätigt, dass eine Annealingtemperatur von 67°C zu hoch ist. Es empfiehlt sich für die

Real-time PCR die höchstmögliche Annealingtemperatur zu verwenden, bei der noch keine Erhöhung der C_t -Werte bei dem Standard mit der höchsten DNA-Konzentration stattgefunden hat.

Die Schmelzkurvenanalysen bestätigen, dass es bei allen Amplifikationsprodukten um Erdnuss-spezifische handelt. Alle Proben ergeben bei 84°C einen spezifischen, hohen Peak und bei 79°C-80°C einen niedrigen. Diese niedrigen Peaks entsprechen der schwachen, zweiten Bande im Agarosegel. Lediglich bei 63°C bildet eine NTC ein unspezifisches PCR-Produkt, was nicht weiter stört. Eine Verdünnung von 0,01% bildet bei 65°C neben dem spezifischen Erdnussamplikon ein weiteres unspezifisches Produkt, was den höheren C_t -Wert dieser Probe erklärt.

Stand. [%]	mittlere C_t -Werte \pm SD									
	61°C		63°C		64°C		65°C		67°C	
100	21,25	0,245	21,21	0,259	21,26	0,371	21,21	0,134	22,08	0,376
10	24,68	0,267	24,72	0,046	24,59	0,325	24,96	0,218	25,64	0,255
1	27,99	0,247	28,36	0,186	28,31	0,571	28,28	0,140	28,94	0,432
0,1	31,60	0,703	31,07	0,285	31,27	0,234	31,06	0,178	32,24	0,424
0,01	33,76	0,341	33,05 ⁺	0,572	24,38 [*]	0,537	34,52 ⁺	0,856	41,90 [*]	-

Tab. 4. 3. Vergleich der mittleren C_t -Werte der Temperaturversuche von Arah3AF/Arah3ABR bei 61°C bis 67°C

* zwei Proben konnten nicht bestimmt werden

⁺ eine Probe konnte nicht bestimmt werden

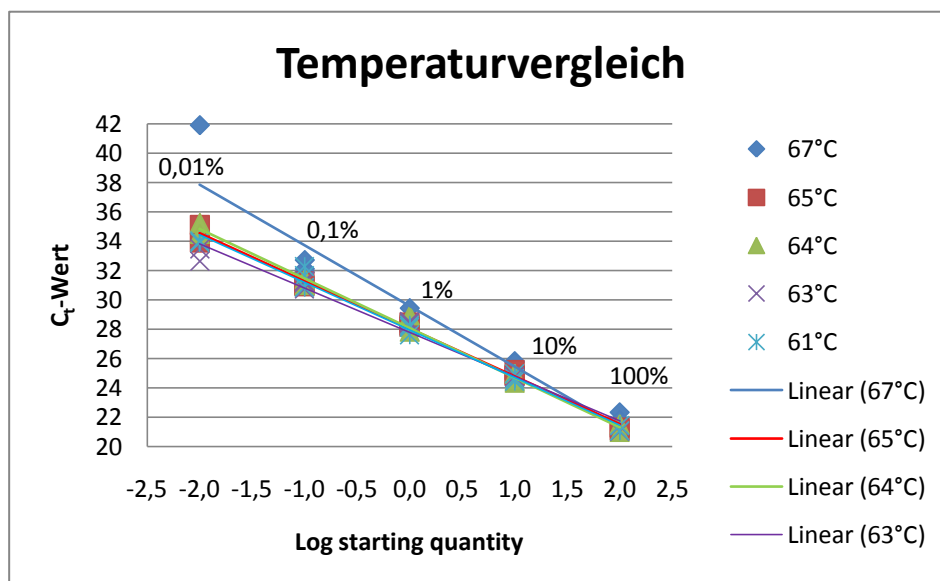


Abb. 4. 27. Vergleich der Standardgeraden der Temperaturversuche von Arah3AF/Arah3ABR bei 61°C bis 67°C

	61°C	63°C	64°C	65°C	67°C
Steigung	-3,175	-3,019	-3,331	-3,251	-4,135
Effizienz [%]	107	114	100	103	75
R²	0,987	0,982	0,993	0,993	0,919

Tab. 4. 4. Vergleich von Steigung, Effizienz und R² der Temperaturversuche von Arah3AF/Arah3ABR bei 61°C bis 67°C

Die Standards 1 bis 5 entsprechen 195 ng/μl bis 19,5 pg/μl Erdnuss-DNA. Die Annealingtemperaturen 64°C und 65°C liefern die besten Ergebnisse. Ihre guten Werte für die Steigung der Standardgerade resultieren in guten Effizienzen von 100% und 103%, die laut BIORAD und INVITROGEN im Bereich einer robusten, reproduzierbaren Reaktion liegen.

R² gibt Auskunft, wie linear die Daten sind. Die Linearität ermöglicht ein Abschätzen der Variabilität der Replikate. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der erhaltenen C_t-Werte von Mehrfachansätzen senkt den Wert von R². Für effiziente Real-time PCR Reaktionen muss R² Werte größer 0,980 annehmen [BIORAD, 2006]. Die Werte von R² bei 64°C und 65°C erfüllen mit 0,993 eindeutig diese Voraussetzung.

Aber es ist auch festzuhalten, dass sich der spezifische Nachweis bei der Verdünnung 1:100 000 bereits am Limit bewegt, da von drei Reaktionsansätzen sind nur zwei bzw. ein C_t-Werte erhalten worden.

- **Temperatur/Zeitversuch mit zweistufiges Temperatur-/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5**

Bei diesem Versuch soll die optimale Annealingzeit für die Annealingtemperatur von 64°C bzw. 63°C für das Primerpaar Arah3AF/Arah3ABR ermittelt werden. Zweistufiges Temperatur/Zeitprotokoll bedeutet 10s Denaturierungsphase bei 95°C und variierende Annealingphasen bei 64°C bzw. 63°C.

Bei allen nachfolgenden Abbildungen stellen die **roten** Kurven Standard 1 (100%), die **orange**n Standard 2 (10%), die **türkisen** Standard 3 (1%), die **grünen** Standard 4 (0,1%), die **blauen** Standard 5 (0,01%) und die schwarzen Kurven die NTC dar. Der Threshold wurde einheitlich bei 5 festgelegt, um die C_t-Werte miteinander vergleichen zu können.

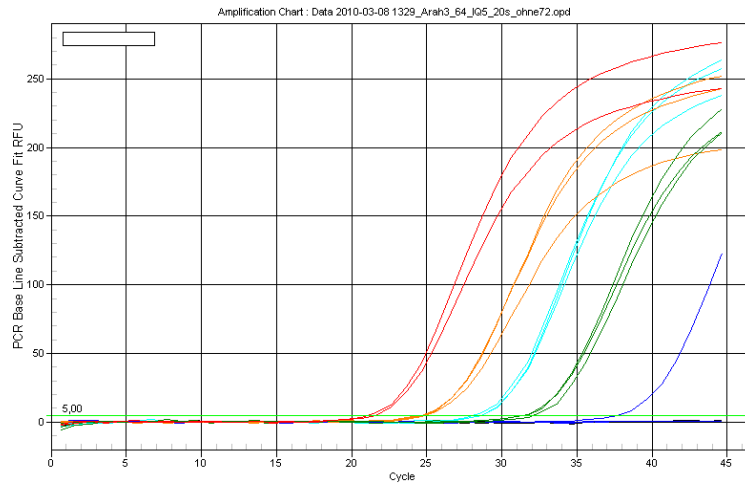


Abb. 4. 28. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C 20s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

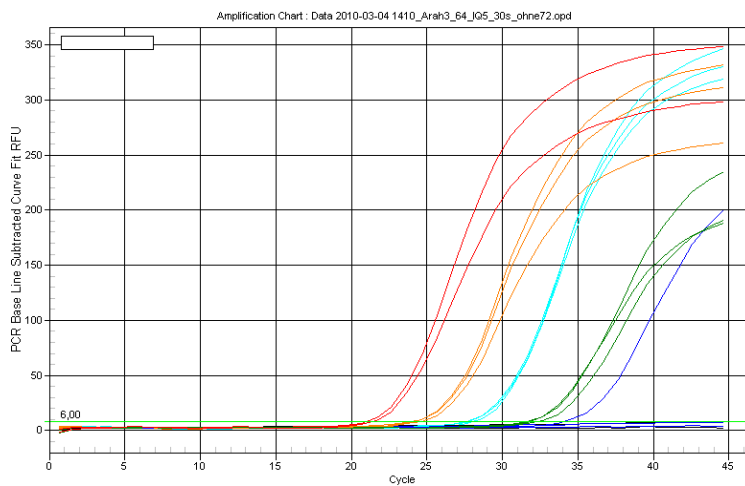


Abb. 4. 29. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C 30s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

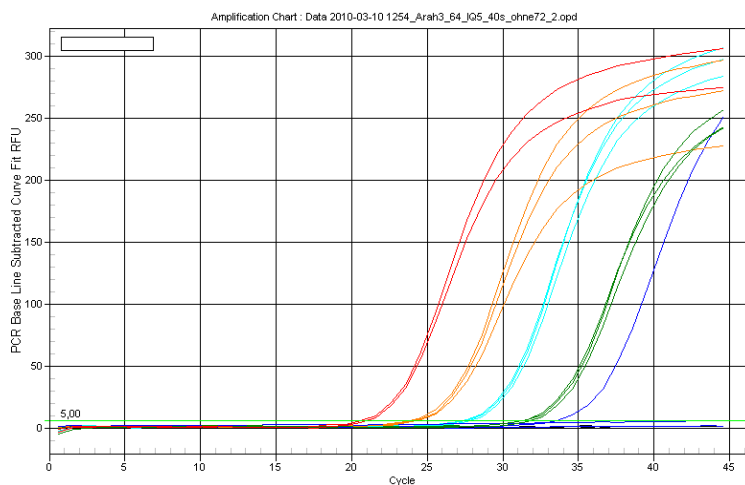


Abb. 4. 30. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C 40s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

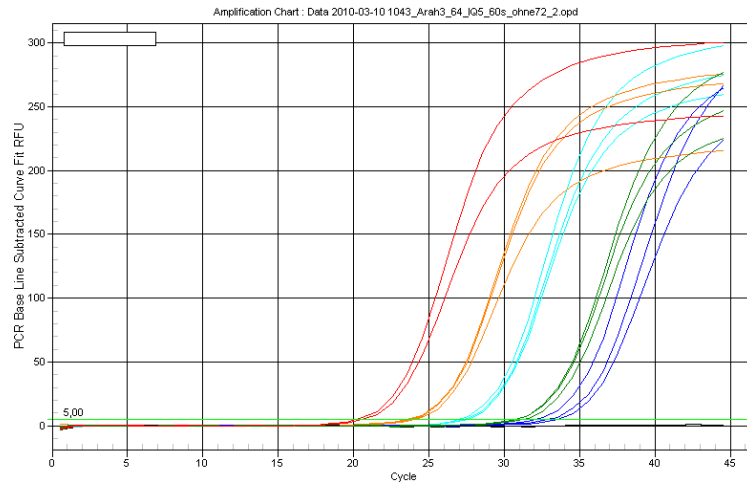


Abb. 4. 31. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

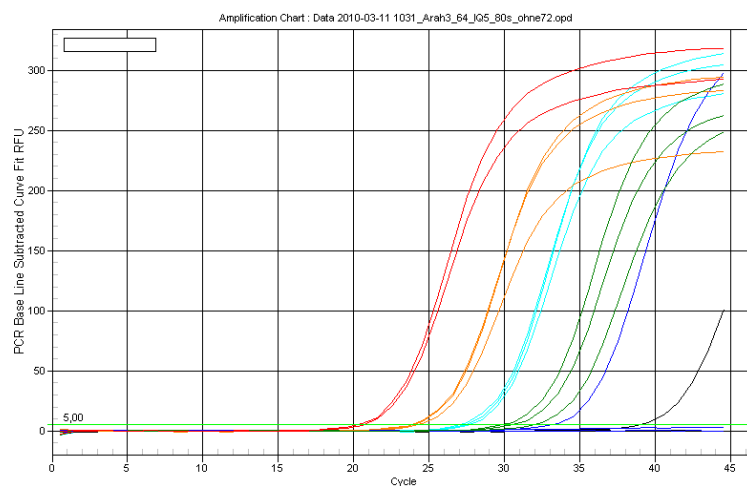


Abb. 4. 32. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 64°C 80s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

Aus den Abbildungen der Amplifikationskurven bei 64°C mit verschiedenen Annealingzeiten geht hervor, dass sowohl eine zu kurze Annealingzeit (20s und 30s), vor allem wenn keine zusätzliche Elongationsphase vorgesehen ist, so wie eine zu lange Annealingzeit (60s und 80s) keine respektablen Ergebnisse erzielen. Verkürzt sich die Zeit für Primerhybridisierung und Polymerisation, sind ineffiziente Amplifikationen die Folge. Exzessive Annealingzeiten erhöhen die Wahrscheinlichkeit von Pseudoanlagerungen der Primer [BIORAD, 2006]. Folglich ist eine adäquate Annealingzeit ebenso wichtig wie eine optimale Annealingtemperatur.

Da keine respektablen Ergebnisse bei keiner Annealingzeit bei 64°C erhalten wurden, lässt sich daraus schließen, dass die Annealingtemperatur von 64°C bei dem verkürzten Temperatur/Zeitprotokoll nicht optimal ist. Aus diesem Grund wurde der Zeitversuch auch mit 63°C durchgeführt.

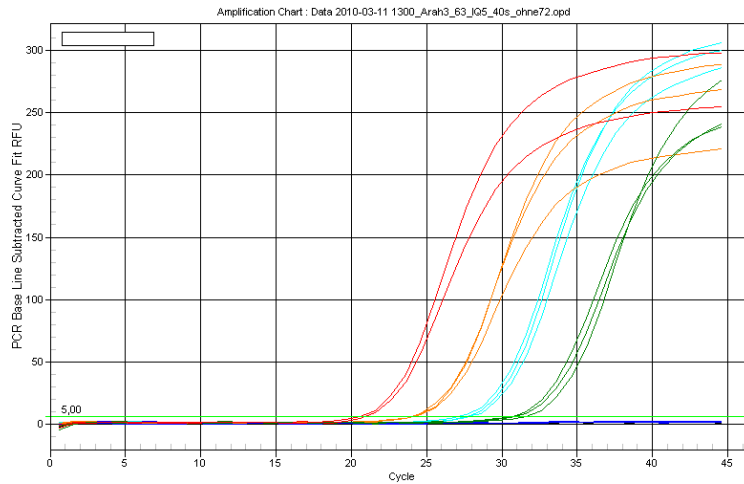


Abb. 4. 33. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C 40s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

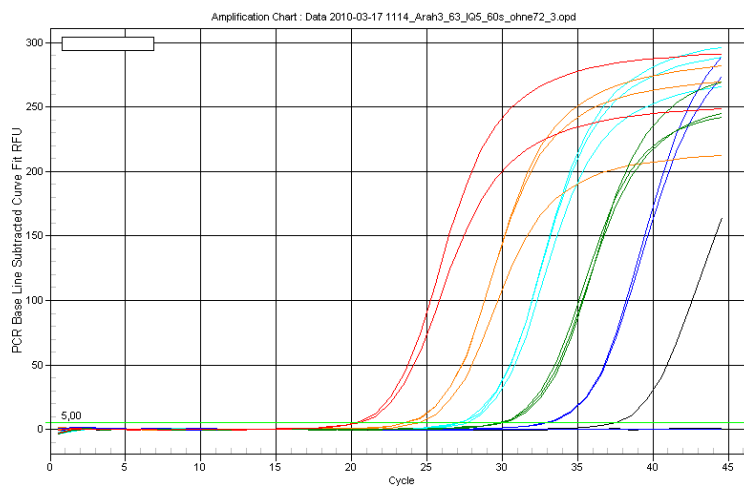


Abb. 4. 34. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

Standards [%]	mittlere C_t -Werte \pm SD			
	63°C-40s		63°C-60s	
100	20,73	0,317	22,49	0,222
10	24,06	0,122	26,06	0,341
1	27,58	0,292	29,23	0,221
0,1	31,04	0,412	32,19	0,186
0,01	-	-	35,33*	0,055

Tab. 4. 5. Vergleich der mittleren C_t -Werte von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C bei 40s und 60s

* eine Probe konnte nicht bestimmt werden

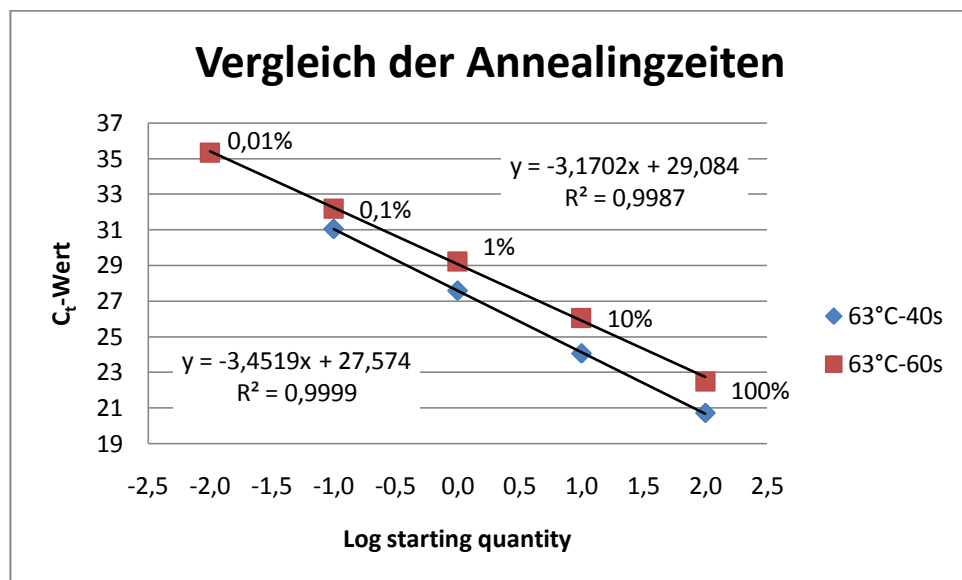


Abb. 4. 35. Vergleich der Standardgeraden von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C bei 40s und 60s

	63°C-40s	63°C-60s
Steigung	-3,452	-3,170
Effizienz [%]	95	107
R^2	0,999	0,999

Tab. 4. 6. Vergleich von Steigung, Effizienz und R^2 von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C bei 40s und 60s

Bei der Annealingtemperatur von 63°C und der Annealingzeit von 40s ist zwar die Effizienz besser als bei 60s, aber die Empfindlichkeit geringer, da Standard 5 nicht amplifiziert wurde. Daher wurden die ebenfalls guten Ergebnisse von 63°C-60s als Optimum betrachtet.

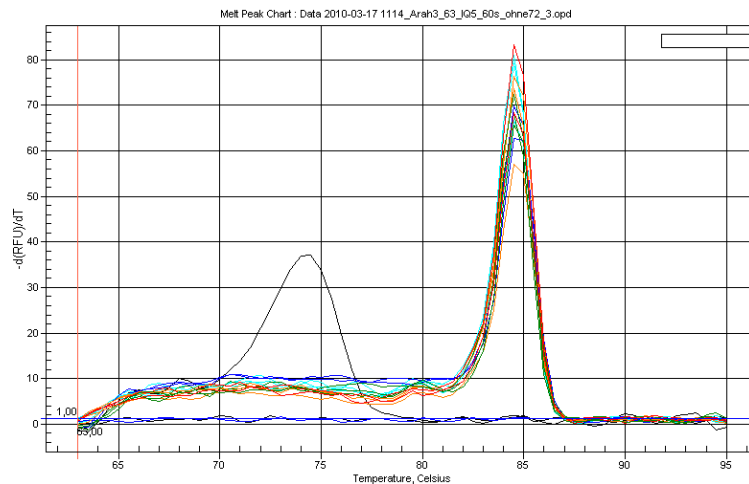


Abb. 4. 36. Schmelzkurvenanalyse von Arah3AF/Arah3ABR (AT 63°C-60s; 2stufig)

Die Amplifikationsprodukte aller Verdünnungen sind eindeutig Erdnuss-spezifisch. Die Amplifikationskurve der NTC wird als ein unspezifisches, vermutliches Primerdimerprodukt aufgrund der niedrigeren Schmelztemperatur identifiziert, und beeinflusst die Ergebnisse nicht.

Interessant ist, dass die Ergebnisse des dreistufigen Temperatur/Zeitprogramms für 63°C deutlich von denen des zweistufigen Temperatur/Zeitprogramms bei 60s Annealingzeit abweichen.

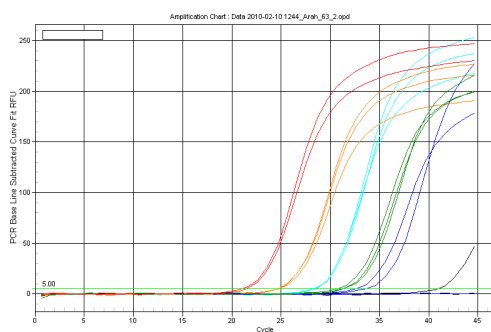


Abb. 4. 37. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C mit 3stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

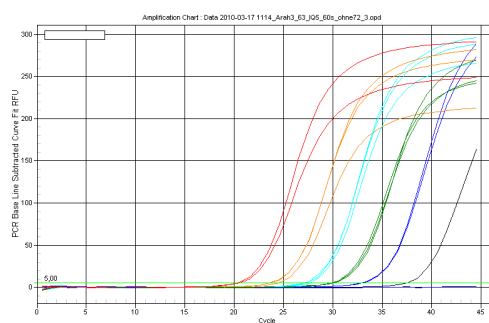


Abb. 4. 38. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5

Standards [%]	mittlere C_t -Werte \pm SD			
	63°C dreistufig		63°C-60s zweistufig	
100	21,21	0,259	22,49	0,222
10	24,72	0,046	26,06	0,341
1	28,36	0,186	29,23	0,221
0,1	31,07	0,285	32,19	0,186
0,01	33,05*	0,572	35,33*	0,055

Tab. 4. 7. Vergleich der mittleren C_t -Werte von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C dreistufig und 63°C-60s zweistufig

* eine Probe konnte nicht bestimmt werden

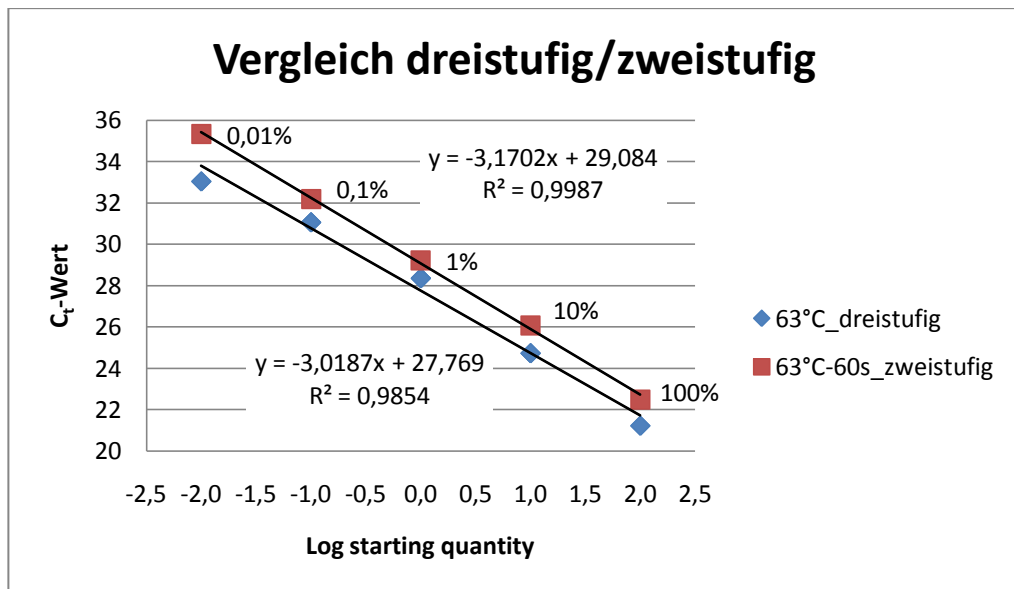


Abb. 4. 39. Vergleich der Standardgeraden von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C dreistufig und 63°C-60s zweistufig

	63°C dreistufig	63°C-60s zweistufig
Steigung	-3,019	-3,170
Effizienz [%]	114	107
R^2	0,985	0,999

Tab. 4. 8. Vergleich von Steigung, Effizienz und R^2 von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C dreistufig und 63°C-60s zweistufig

In Summe stehen bei beiden Läufen 60s Reaktionszeit zur Verfügung und dennoch unterscheiden sich die Ergebnisse. Bei dem zweistufigen Programm sind die Ergebnisse wesentlich besser, da die Aufheizung- bzw. Abkühlungsphasen wegfallen. Die Aufheizung- bzw. Abkühlungsphasen zwischen den einzelnen Temperaturschritten scheinen folglich einen Einfluss auf die Amplifikation zu haben.

- **Materialversuch mit zweistufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5**

Bei den bisherigen Versuchen wurden als Reaktionsgefäße immer 8er Reaktionsstreifen mit gewölbtem Deckel (*high profile*) verwendet. Es stellt sich die Frage, ob die Art des Reaktionsgefäßes einen Einfluss auf die Ergebnisse, und zwar auf die Fluoreszenzmessung, ausübt. Daher wurden zum Vergleich mit den bisher verwendeten Reaktionsgefäßen Versuche mit 8er Reaktionsstreifen mit flachen Deckeln (*high profile*) durchgeführt.

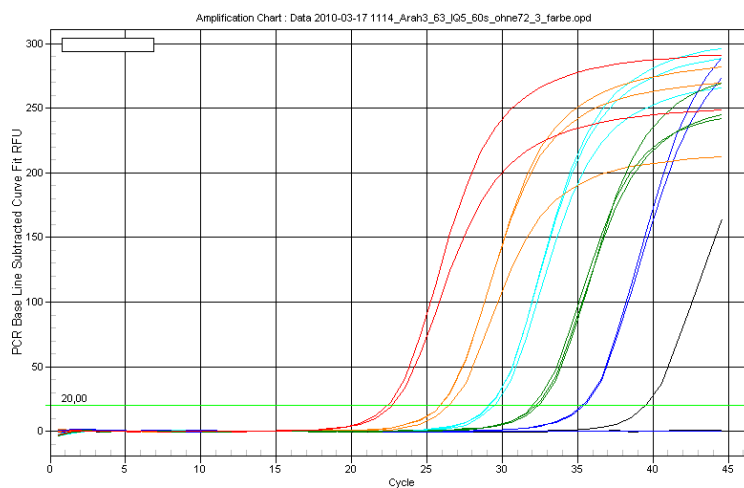


Abb. 4. 40. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5 – Reaktionsgefäße mit gewölbten Deckeln

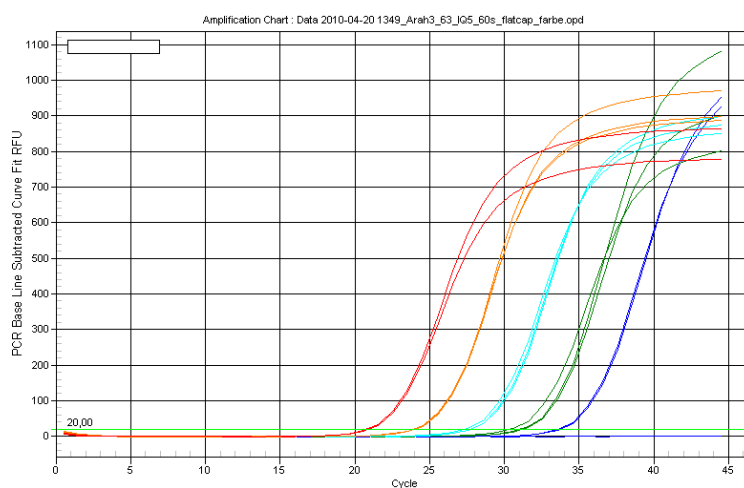


Abb. 4. 41. Amplifikationskurven von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit IQ5 – Reaktionsgefäße mit flachen Deckeln

Ein gravierender Unterschied zwischen den beiden Reaktionsgefäßen liegt in der Stärke des Fluoreszenzsignals. Ist der Deckel flach ist das Fluoreszenzsignal rund dreimal stärker als wenn der Deckel gewölbt ist. Des Weiteren hat das Material einen Einfluss auf die Höhe der C_t -Werte und die Präzision der Replikate.

Standards [%]	mittlere C_t -Werte \pm SD			
	63°C-60s gewölbter Deckel		63°C-60s flacher Deckel	
100	22,49	0,222	20,85	0,024
10	26,06	0,341	23,93	0,014
1	29,23	0,221	27,61	0,187
0,1	32,19	0,186	30,85	0,438
0,01	35,33*	0,055	33,67*	0,069

Tab. 4. 9. Vergleich der mittleren C_t -Werte von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C-60s mit unterschiedlichen Reaktionsgefäßen

* eine Probe konnte nicht bestimmt werden

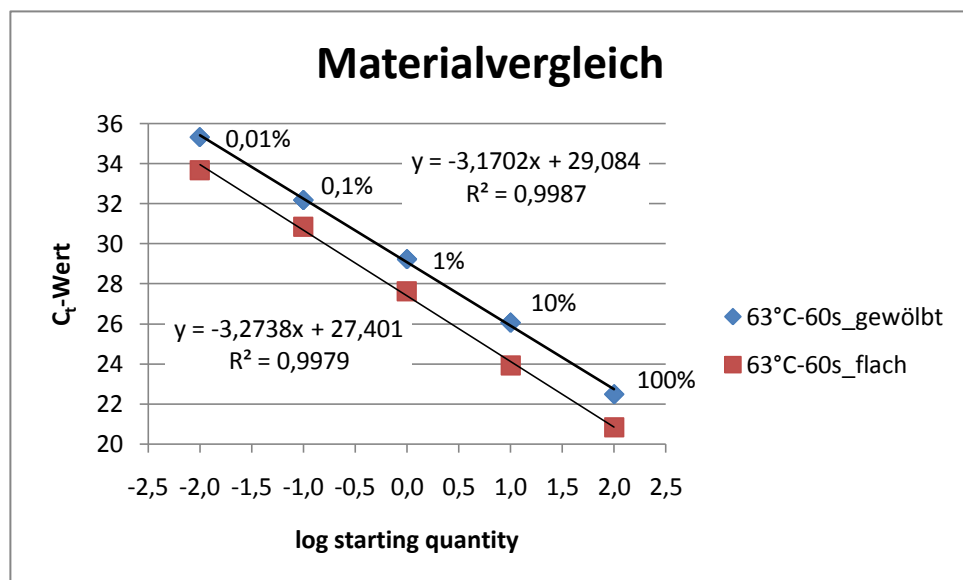


Abb. 4. 42. Vergleich der Standardgeraden von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C-60s mit unterschiedlichen Reaktionsgefäßen

	63°C-60s gewölbter Deckel	63°C-60s flacher Deckel
Steigung	-3,170	-3,274
Effizienz [%]	107	102
R^2	0,999	0,998

Tab. 4. 10. Vergleich von Steigung, Effizienz und R^2 der Materialversuche von Arah3AF/Arah3ABR bei 63°C-60s

Obwohl unter denselben Reaktionsbedingungen durchgeführt, verzögert der gewölbte Deckel den signifikanten Anstieg des Fluoreszenzsignals um etwa zwei C_t -Werte und

hat eindeutig Auswirkungen auf die Präzision der Mehrfachansätze. Bei der Verwendung von Reaktionsgefäßen mit flachen Deckeln können deutlich bessere Werte für die Standardabweichungen der einzelnen Verdünnungen erzielt werden. Das erklärt die schlechte Präzision der Replikate in vorhergehenden Versuchen trotz optimaler Annealingtemperatur und –zeit.

4.3.2. Nachweis des Sesam-Allergens *Ses i 1*

Die Vorgehensweise ist dieselbe wie bei dem Nachweis des Erdnuss-Allergens. Es wurde mit der aus Sesam isolierten DNA (200 ng/µl) eine Standardreihe mit Verdünnungen von 1:10 bis 1:10000 erstellt, was Konzentrationen bis 20 pg/µl (= Standard 5; 0,01%) Sesam-DNA entspricht, und die optimalen Annealingtemperaturen und –zeiten der Primerpaare ermittelt. Bei den Primern handelt es sich um dieselben wie bei der speziesspezifischen PCR. Die mit deren Hilfe ermittelte, optimale Annealingtemperatur plus 3°C wird als Ausgangswert für die Real-time PCR herangezogen.

4.3.2.1. Primerpaar SesamPr1F/SesamPr1R

Ausgehend von 65°C, wurde die Annealingtemperatur in 2°C Abstände erhöht und gesenkt. Da bei dem Primerpaar Arah3AF/Arah3ABR bereits festgestellt wurde, dass das zweistufige Temperatur/Zeitprotokoll die besseren Ergebnisse liefert, wurde der Temperaturversuch mit SesamPr1F/SesamPr1R gleich mit dem zweistufigen Programm mit dem Real-time Cycler CFX96 durchgeführt und nur mehr Reaktionsgefäße mit flachen Deckeln verwendet. Da der Temperaturversuch mit Arah3AF/Arah3ABR bereits ausführlich erläutert wurde, wird mit SesamPr1F/SesamPr1R gleich die optimale Annealingtemperatur und –zeit präsentiert.

Bei allen nachfolgenden Abbildungen stellen die **roten** Kurven Standard 1 (100%), die **orangenen** Standard 2 (10%), die **rosa-gefärbten** Standard 3 (1%), die **grünen** Standard 4 (0,1%), die **blauen** Standard 5 (0,01%) und die schwarzen Kurven die NTC dar. Der

Threshold wurde einheitlich bei 100 festgelegt, um die C_t -Werte miteinander vergleichen zu können.

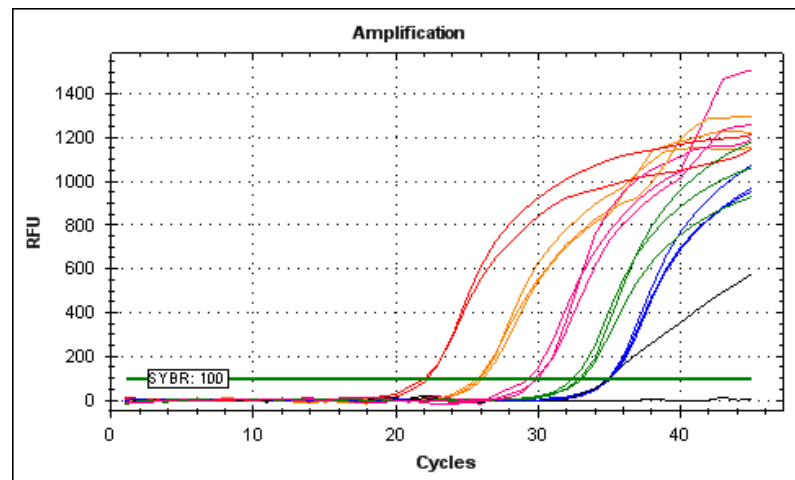


Abb. 4. 43. Amplifikationskurven von SesamPr1F/SesamPr1R bei 65°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96-high profile

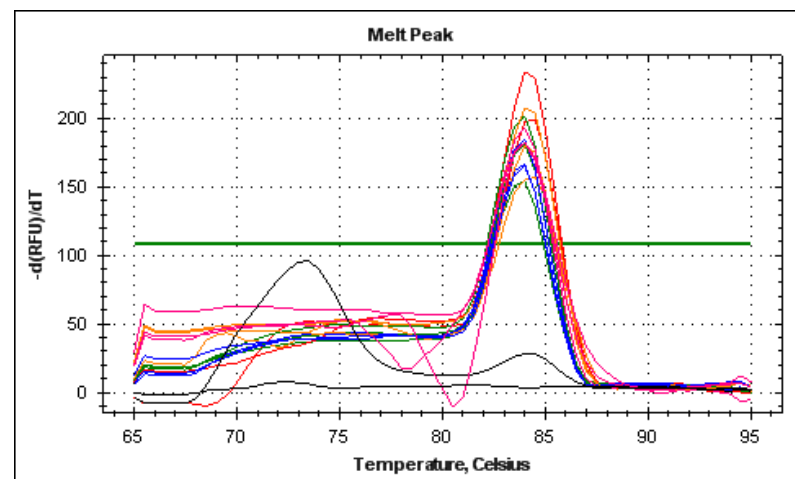


Abb. 4. 44. Schmelzkurvenanalyse von SesamPr1F/SesamPr1R (AT 65°C-60s; 2stufig)

Die optimale Annealingtemperatur wurde für SesamPr1F/SesamPr1R bei 65°C festgelegt. 60s Annealingzeit haben sich auch hier bei dem zweistufigen Temperatur/Zeitprogramm als ideal herausgestellt. Auffallend ist jedoch, dass die Amplifikationskurven im Bereich der Plateauphase sehr unruhig sind. Das alleine stellt nicht unbedingt ein Problem dar, da nur die exponentielle Phase für die Bestimmung der C_t -Werte ausschlaggebend ist [BIORAD, 2006]. Da jedoch auch die Präzision der Mehrfachansätze nicht ideal ist, besteht der Verdacht, dass für die

Fluoreszenzmessung keine optimalen Bedingungen vorliegen. Aufgrund der gemachten Erfahrung, dass die Art der Reaktionsgefäße die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen können, liegt die Vermutung nahe, dass für das sensible Detektionssystem des CFX96, *high profile* Gefäße nicht optimal sind. Weitere Versuche mit *low profile* Reaktionsgefäßen mit flachen Deckeln sind daher erforderlich.

Die Schmelzkurvenanalyse für SesamPr1F/SesamPr1R bei 65°C bestätigt, dass alle Amplifikationsprodukte Sesam-spezifische sind. Der Peak der NTC weist eine deutlich geringere Schmelztemperatur als das spezifische Sesamamplikon auf, und wird daher als unproblematisch angesehen.

Derselbe Versuch wurde mit *low profile* Reaktionsstreifen durchgeführt.

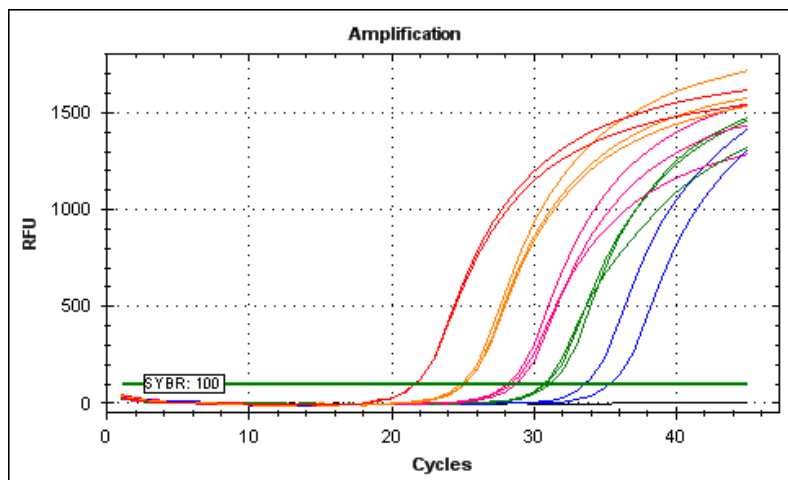


Abb. 4. 45. Amplifikationskurven von SesamPr1F/SesamPr1R bei 65°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96-low profile

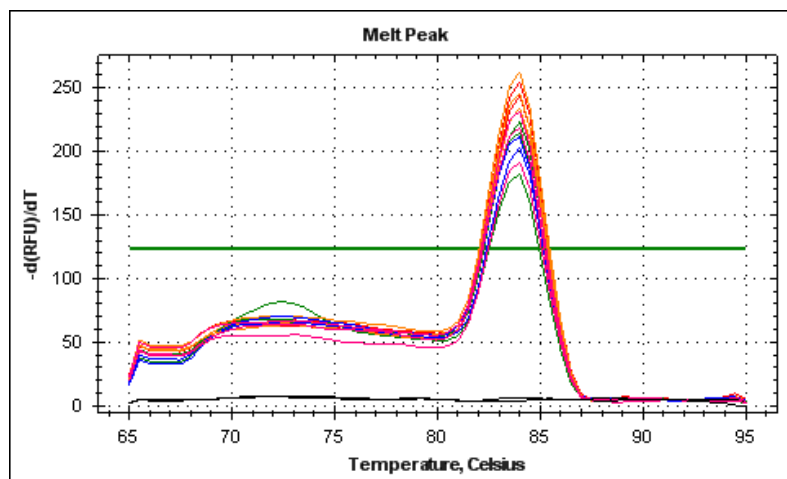


Abb. 4. 46. Schmelzkurvenanalyse von SesamPr1F/SesamPr1R (AT 65°C-60s; 2stufig)

Die Ergebnisse der Abbildung 4.45. bestätigen die Vermutung, dass ungeeignete Reaktionsgefäße die Fluoreszenzmessung beeinflussen. Daher werden für die Versuche mit CFX96 nur mehr *low profile* Reaktionsstreifen mit flachen Deckeln verwendet.

Da Standard fünf sehr schlechte Werte aufweist, wurde eine Wiederholung veranlasst und dabei trat ein interessantes Phänomen auf.

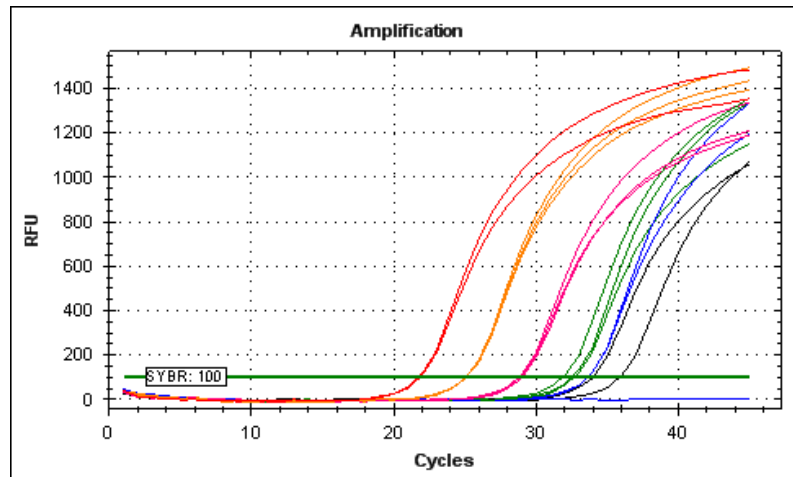


Abb. 4. 47. Amplifikationskurven von SesamPr1F/SesamPr1R bei 65°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96-low profile

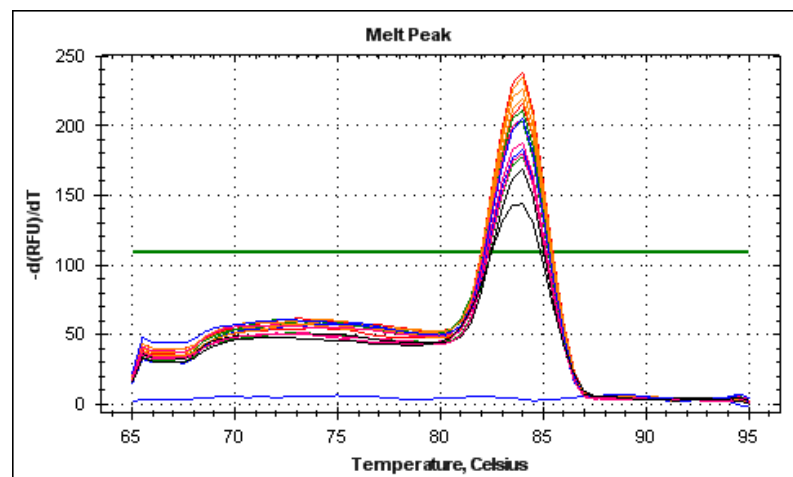


Abb. 4. 48. Schmelzkurvenanalyse von SesamPr1F/SesamPr1R (AT 65°C-60s; 2stufig)

Wie in Abbildung 4.47. ersichtlich, bilden beide NTCs Amplifikationskurven aus, was an sich nicht ungewöhnlich ist. Betrachtet man aber Abbildung 4.48., so lassen sich beide NTCs mittels Schmelzkurvenanalyse als Sesam-spezifische Peaks identifizieren, was ein gravierendes Problem darstellt.

Der erste Verdacht lautete Kontamination. Womöglich wurde im Zuge des Pipettierens Sesam-DNA in ein wiederverwendbares Reagenz verschleppt oder die NTC Ansätze direkt kontaminiert. Als Konsequenz wurden alle Reagenzien mehrmals ausgetauscht und der Versuch mehrmals wiederholt, immer mit demselben Ergebnis: positive NTC. Des Weiteren wurde versucht die Annealingtemperatur zu erhöhen, da dadurch die Wahrscheinlichkeit der Bildung unspezifischer Produkte reduziert wird [BIORAD, 2006]. Es wurden keine besseren Ergebnisse erhalten.

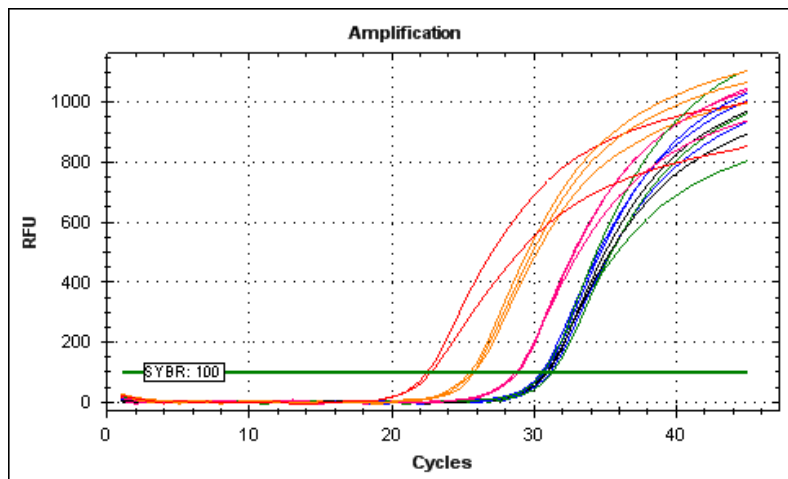


Abb. 4. 49. Amplifikationskurven von SesamPr1F/SesamPr1R bei 67°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96-low profile

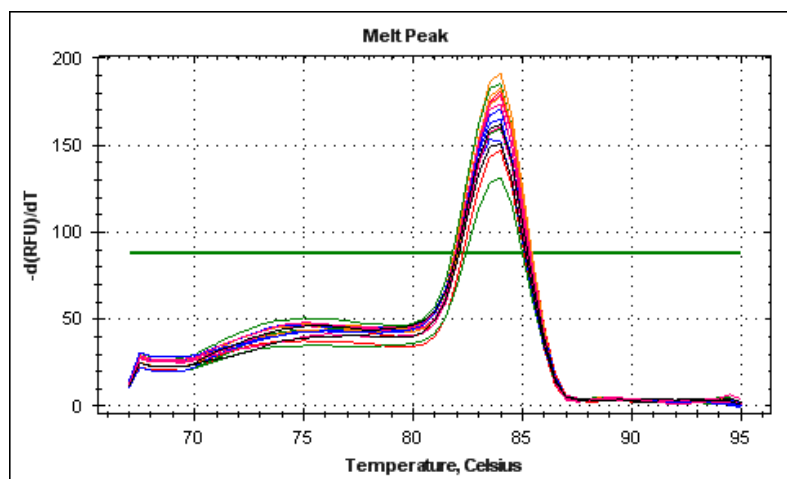


Abb. 4. 50. Schmelzkurvenanalyse von SesamPr1F/SesamPr1R (AT 67°C-60s; 2stufig)

Wenn eine Kontamination ausgeschlossen ist, dann bildet offensichtlich das Primerpaar SesamPr1F/SesamPr1R ein PCR-Produkt, das dieselbe Größe wie das Sesam-spezifische Amplikon aufweist. Eine Bestätigung dieser Vermutung und, warum

dieses Phänomen in den ersten Versuchen mit gleichen Bedingungen nicht auftrat, konnte im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht geklärt werden.

4.3.2.2. Primerpaar SesamPr2F/SesamPr2R

Auch für dieses Primerpaar soll die optimale Annealingtemperatur und –zeit ermittelt werden. 61°C als Ausgangswert angenommen, wurde die Annealingtemperatur in 2°C Abstände erhöht und gesenkt. Da bereits in vorhergehenden Versuchen bestätigt wurde, dass das zweistufige Temperatur/Zeitprotokoll und *low profile* Reaktionsgefäße mit flachen Deckeln bei CFX96 die besten Ergebnisse erzielen, wurde das in den nachfolgenden Versuchen berücksichtigt. Der Temperaturversuch ist bei vorherigen Versuchen bereits detailliert erläutert worden, daher werden für SesamPr2F/SesamPr2R nur mehr die optimalen Annealingtemperaturen und –zeiten angegeben.

Bei allen nachfolgenden Abbildungen stellen die **roten** Kurven Standard 1 (100%), die **orangenen** Standard 2 (10%), die **rosa-gefärbten** Standard 3 (1%), die **grünen** Standard 4 (0,1%), die **blauen** Standard 5 (0,01%) und die schwarzen Kurven die NTC dar. Der Threshold wurde einheitlich bei 75 festgelegt, um die C_t -Werte miteinander vergleichen zu können.

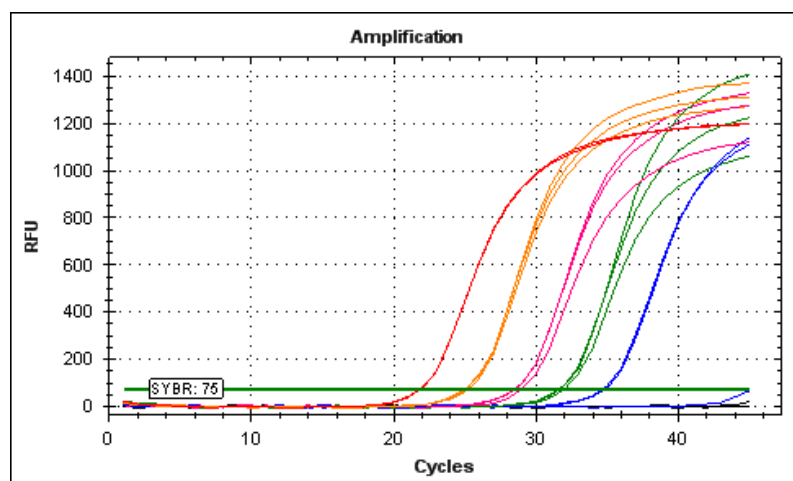


Abb. 4. 51. Amplifikationskurven von SesamPr2F/SesamPr2R bei 62°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96

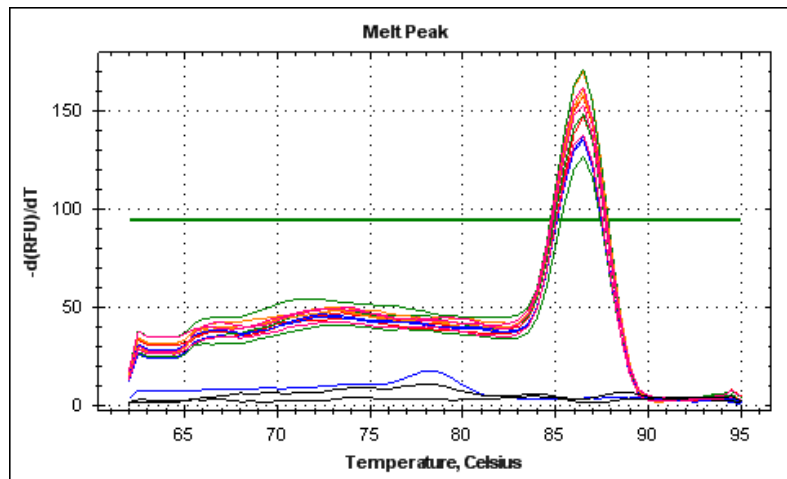


Abb. 4. 52. Schmelzkurvenanalyse von SesamPr2F/SesamPr2R (AT 62°C-60s; 2stufig)

Die Amplifikationskurven der einzelnen Verdünnungen von SesamPr2F/SesamPr2R bei 62°C-60s liegen schön rund 3,3 Zyklen auseinander und die Schmelzkurvenanalyse zeigt, dass keine unspezifischen Produkte gebildet worden sind. Ein Vergleich der C_t -Werte mit anderen Annealingtemperaturen bekräftigt die Annahme, dass es sich bei 62°C-60s um das optimale Temperatur/Zeitprogramm handelt.

Standards [%]	mittlere C_t -Werte \pm SD					
	62°C		64°C		66°C	
100	21,90	0,064	22,01	0,143	22,21	0,026
10	25,14	0,099	25,21	0,184	25,60	0,138
1	28,68	0,281	28,85	0,242	29,20	0,187
0,1	31,78	0,232	32,02	0,663	32,15	0,165
0,01	34,82*	0,160	34,99*	0,196	34,14 ⁺	-

Tab. 4. 11. Vergleich der mittleren C_t -Werte von SesamPr2F/SesamPr2R bei 62°C bis 66°C

* eine Probe konnte nicht bestimmt werden

⁺ zwei Proben konnten nicht bestimmt werden

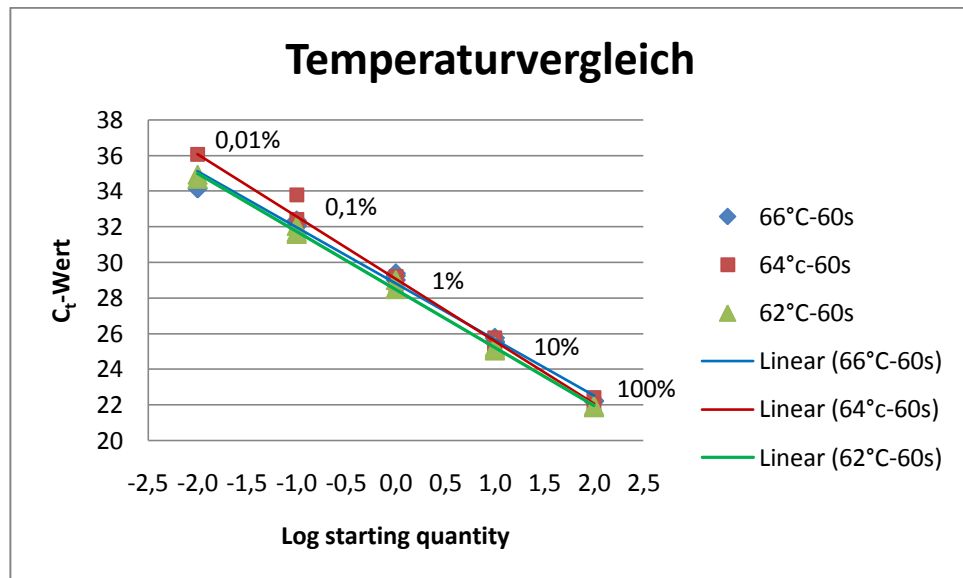


Abb. 4. 53. Vergleich der Standardgeraden von SesamPr2F/SesamPr2R bei 62°C bis 66°C

	62°C-60s	64°C-60s	66°C-60s
Steigung	-3,254	-3,506	-3,153
Effizienz [%]	103	93	108
R ²	0,998	0,988	0,989

Tab. 4. 12. Vergleich von Steigung, Effizienz und R² von SesamPr2F/SesamPr2R bei 62°C bis 66°C

Die Standards 1 bis 5 entsprechen 200 ng/μl bis 10 pg/μl Sesam-DNA. Die Effizienz von 103% und R² von 0,998 bestätigen, dass mit 62°C-60s die besten Werte erzielt werden.

4.3.2.3. Primerpaar SesF/SesR

Für das Austesten der Annealingtemperatur und –zeit wurde als Ausgangswert 68°C angenommen. Auch bei diesem Primerpaar trat das Phänomen der positiven NTC auf. Da es nicht möglich war, dieses Problem zu beheben, wurden mit SesF/SesR keine weiteren Versuche durchgeführt.

Bei allen nachfolgenden Abbildungen stellen die roten Kurven Standard 1 (100%), die orangen Standard 2 (10%), die rosa-gefärbten Standard 3 (1%), die grünen Standard 4 (0,1%), die blauen Standard 5 (0,01%) und die schwarzen Kurven die NTC dar.

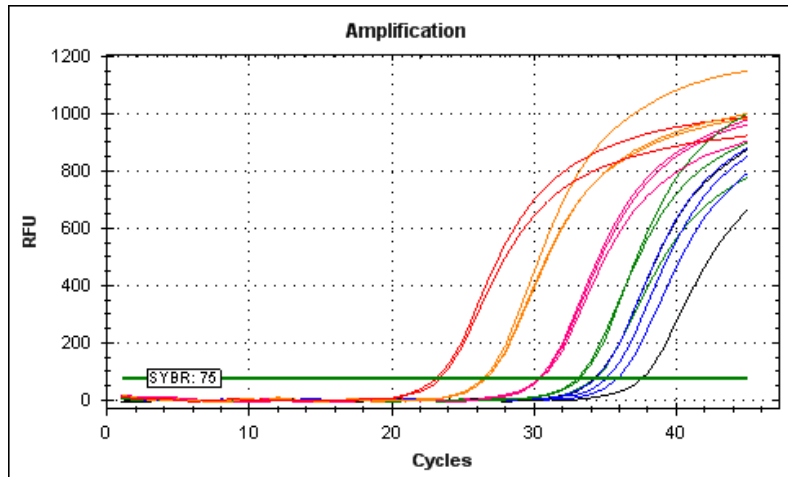


Abb. 4. 54. Amplifikationskurven von *SesF/SesR* bei 68°C 60s lang mit 2stufigem Temperatur/Zeitprotokoll durchgeführt mit CFX96

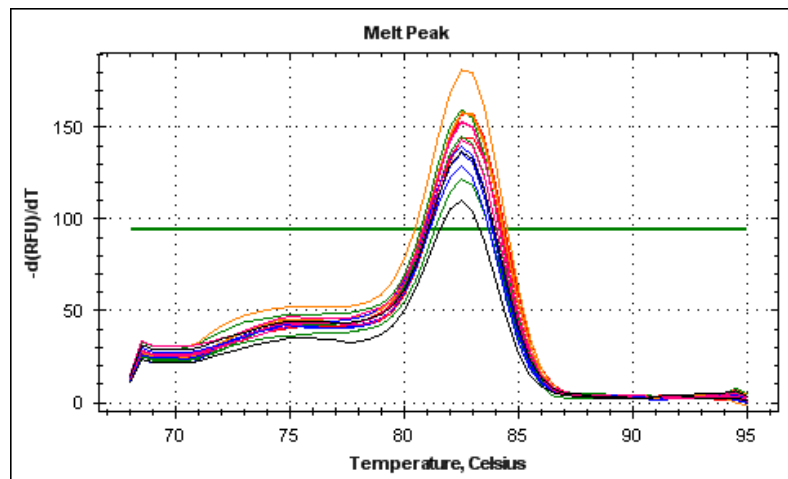


Abb. 4. 55. Schmelzkurvenanalyse von *SesF/SesR* (AT 68°C-60s; 2stufig)

5. Schlussbetrachtung

Die PCR ist eine effektive Technologie, um sehr geringe Mengen von spezifischen DNA-Fragmenten zu amplifizieren, und so einen Nachweis ermöglichen. Ein Nachteil der Endpunkt-PCR ist, dass für die Detektion der Amplifikationsprodukte eine weitere Analysemethode herangezogen werden muss [INVITROGEN, 2008]. In dieser Diplomarbeit wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Bei der Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung der zu untersuchenden Substanzen sowohl nach der Ladung als auch nach der Größe der Moleküle. Um die Nukleinsäurefragmente zuzuordnen und ihre Größe abschätzen zu können, werden Größenstandards immer mit aufgetrennt [DECHERT, 2007].

Diese Diplomarbeit zeigt, dass die Ergebnisse von PCR-Agarosegelelektrophorese einen guten Überblick über die Spezifität der Primer (spezifisch für *Ara h 3* oder *Ses i 1*) geben, aber für eine Identifizierung der Nachweisgrenzen und für Quantifizierungen ist diese Methode nicht anwendbar, da mit Agarosegelelektrophoresen bestenfalls semiquantitative Ergebnisse erzielt werden können. Hierfür haben sich Real-time PCR Untersuchungen bewährt.

Ein Vorteil der Real-time PCR gegenüber Endpunkt-PCR ist die Möglichkeit, den Fortschritt der PCR-Reaktion in Echtzeit zu verfolgen. Des Weiteren kann die Menge der gebildeten Amplikone nach jedem Zyklus präzise gemessen werden. Arbeitsaufwand und Analysenzeit verkürzen sich durch die Kombination von Amplifikation und Detektion [BIORAD, 2006; INVITROGEN, 2008].

Die Ergebnisse der Real-time PCR Versuche bestätigen die Spezifität der eingesetzten Primerpaare und zeigen deren Nachweisgrenzen auf. In einer 10000fachen Verdünnung der Ausgangs-DNA, was einer Konzentration von 19,5 pg/µl Erdnuss-DNA und 20 pg/µl Sesam-DNA entspricht, kann sowohl Erdnuss mit Arah3AF/Arah3ABR als auch Sesam mit SesamPr2F/SesamPr2R spezifisch nachgewiesen werden.

Die Untersuchungsergebnisse dieser Diplomarbeit weisen auch auf die Signifikanz von optimalen Reaktionsbedingungen hin. Geeignete Konzentrationen der Reagenzien, optimale Annealingtemperaturen und –zeiten, sowie eine passende Auswahl der Reaktionsgefäße für jeden Real-time Thermocycler sind wichtige Faktoren, die einen wesentlichen Einfluss auf Effizienz, Reproduzierbarkeit und Linearität der Ergebnisse ausüben. In dieser Arbeit haben sich das zweistufige Temperatur/Zeitprogramm, Annealingzeiten von 60 Sekunden bei entsprechenden Annealingtemperaturen und Reaktionsgefäße unterschiedlicher Höhe (*high profile* für IQ5 und *low profile* für CFX96) mit flachen Deckeln bewährt.

Die Anwendbarkeit von PCR bei Analysen von Lebensmittelallergenen wird umstritten diskutiert, aufgrund der Tatsache, dass mit PCR nicht das Allergen selbst, sondern „nur“ ein spezifisches DNA-Fragment detektiert wird [KIRSCH et al., 2009]. Etliche wissenschaftliche Publikationen demonstrieren, dass sich Real-time PCR Methoden sehr wohl dazu eignen, Spuren von potentiell allergenen Erdnüssen [HIRD et al., 2003; SCARAVELLI et al., 2008 und 2009; STEPHAN und VIETHS, 2004] und Sesam [MUSTORP et al., 2008; SCHÖRINGHUMER und CICHNA-MARKL, 2007; SCHÖRINGHUMER et al., 2009] effizient in Lebensmitteln nachzuweisen.

Mit dieser Diplomarbeit konnten die Grundlagen für eine Real-time PCR Methode für den Nachweis von Erdnuss- bzw. Sesam-Allergenen gelegt werden und nach ein paar weiteren Optimierungsschritten sollte ein quantitativer Allergennachweis möglich sein.

6. Zusammenfassung

Aktuelle Studien berichten, dass die Prävalenz von Lebensmittelallergien in industrialisierten Ländern steigt. Da die Aufnahme von Erdnüssen und Sesam bei sensibilisierten Personen oft schwere allergische Reaktionen zur Folge hat, sind zuverlässige Nachweismethoden für Allergene in Lebensmitteln unerlässlich. In der Lebensmittelanalytik nimmt die Bedeutung von molekularbiologischen Methoden zu, daher lag der Schwerpunkt dieser Diplomarbeit in der Optimierung von PCR- und Real-time PCR-Protokollen.

Diese Arbeit hatte zum Ziel, das Erdnuss-Allergen *Ara h 3* und das Sesam-Allergen *Ses i 1* mittels PCR und Real-time PCR nachzuweisen. Aus Erdnuss- bzw. Sesamproben wurde mittels QIAGEN DNeasy^R Tissue Kit (50) die DNA isoliert und ihre Konzentration durch fotometrische Messungen bei 260nm ermittelt. Die Qualität der isolierten DNA wurde über den Quotienten E_{260}/E_{280} berechnet und führte zu dem Schluss, dass die DNA rein vorliegt und für weitere Analysen eingesetzt werden kann.

Um einen Überblick über die Spezifität der eingesetzten Primerpaare zu erlangen, wurden PCRs mit anschließenden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass Arah3AF/Arah3ABR bei einer optimalen AT von 62°C ein 105 bp großes, für Erdnuss spezifisches Amplikon bildet, dass SesamPr1F/SesamPr1R (optimale AT 60°C) und SesamPr2F/SesamPr2R (optimale AT 58°C) sehr Sesam-spezifische Primerpaare, ohne Amplifikationen unspezifischer PCR-Produkte sind und, dass der Einsatz des Sesam-spezifischen Primerpaars SesF/SesR nur bei 65°C AT ohne der Bildung falsch-positiver PCR-Produkte möglich ist.

Eine Bestätigung der Spezifität und Daten über die Sensibilität der verwendeten Primerpaare wurden durch Real-time PCR Analysen erhalten. Arah3AF/Arah3ABR und SesamPr2F/SesamPr2R konnten bis zu 10000fache Verdünnungen der Ausgangs-DNA, was einer Konzentration von 19,5 pg/µl Erdnuss-DNA und 20 pg/µl Sesam-DNA entspricht, spezifisch detektieren. Mit SesamPr1F/SesamPr1R und SesF/SesR konnten keine respektablen Ergebnisse erzielt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war es, optimale Reaktionsbedingungen für die Real-time PRC zu schaffen, indem zwei Temperatur/Zeitprogramme, verschiedene Annealingtemperaturen und –zeiten und unterschiedliche Reaktionsgefäße ausgetestet wurden.

7. Abstract

Recent studies indicate that the prevalence of food allergy is increasing in industrialized countries. The intake of trace amounts of peanut or sesame can cause severe allergic reactions in sensitized individuals. Therefore, reliable detection methods for allergens in foods are essential. Because of the growing significance of DNA-based detection methods, this diploma thesis focuses on the improvement of PCR and real-time PCR protocols.

One aim of the study was to detect the peanut allergen *Ara h 3* and the sesame allergen *Ses i 1* with PCR and real-time PCR. As a first step, the DNA was extracted from crushed peanuts and sesame seeds with QIAGEN DNeasy^R Tissue Kit (50) and quantified by measuring the absorbance at 260nm. The quality of the isolated DNA was determined by calculating the A_{260}/A_{280} ratio.

To obtain an overview of the specificity of the selected primer pairs, PCRs with following agarose gel electrophoresis were used. The results showed that Arah3AF/Arah3ABR amplifies a peanut specific PCR product at optimized AT of 62°C, that SesamPr1F/SesamPr1R (AT 60°C) and SesamPr2F/SesamPr2R (AT 58°C) are characterized by high specificity to sesame and that the use of SesF/SesR is only possible at AT of 65°C without getting false-positive amplification products.

To approve specificity and identify sensitivity of the used primer pairs, real-time PCR analysis would be necessary. With Arah3AF/Arah3ABR and SesamPr2F/SesamPr2R a 10000fold dilution of the initial DNA (corresponding to 19,5 pg/μl peanut-DNA and 20 pg/μl sesame-DNA) could be detected specifically. Real-time PCR didn't work with the primer pairs SesamPr1F/SesamPr1R and SesF/SesR because of positively amplifying no template controls in each run.

The second focus of the diploma thesis was to optimize the reaction conditions for real-time PCR by testing two temperature-time programs, different annealing temperatures and periods and diverse reaction tubes.

8. Literaturverzeichnis

ALBRECHT M, ALESSANDRI S, CONTI A, REUTER A, LAUER I, VIETHS S, REESE G. High level expression, purification and physic- and immunochemical characterization of recombinant Pen a 1: A major allergen of shrimp. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 186-195

BANGSOW T, DEUTSCH U, ENGEL H, KORFHAGE C, LÖFFERT D. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsunterlagen für das molekularbiologische Labor* (Jansohn M, Hrsg). 4. Auflage, Elsevier, GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, 2007.

BEYER K, BARDINA L, GRISHINA G, SAMPSON HA. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: Seed storage proteins as common food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 154-159

BEYER K, GRISHINA G, BARDINA L, SAMPSON HA. Identification of two new sesame allergens: Ses i 6 und Ses i 7. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1554-1556

BEYER K, MORROW E; LI XM, BARDINA L, BANNON GA; BURKS W, SAMPSON HA. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 1077-1081

BIORAD. Real-time PCR applications guide 2006

BLANC F, BERNARD H, ALESSANDRI S, BUBLIN M, PATY E, LEUNG SA, PATIENT KA, WAL JM. Update on optimized purification and characterization of natural milk allergens. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 166-175

BREITENEDER H, EBNER C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 27-36

BREITENEDER H, RADAUER C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 821-830

BUCHANAN R, DENNIS S, GENDEL S, CARLSON D, ACHESON D, ASSIMON SA, BERU N, BOLGER P, CARVAJAL R, COPP C, FALCI K, HARDEN E, KANE R, KVENBERG J, LUCCIOLI S, PARK D, RAYBORNE R, TROXELL T, VIERK K. Approaches to establish thresholds for major allergen and for gluten in food. FDA 2006

BURKS W, BALLMER-WEBER BK. Food allergy. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50: 595-603

CARERI M, ELVIRI L, MANGIA A, MUCCHINO C. ICP-MA as a novel detection system for quantitative element-tagged immunoassay of hidden peanut allergens in food. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387: 1851-1854

CHEHADE M, MAYER L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 3-12

CLARK D, PAZDERNIK N. Molekulare Biotechnologie. Grundlagen und Anwendung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009; 106-109, 181

COHEN A, GOLDBERG M, LEVY B, LESHNO M, KATZ Y. Sesame food allergy in sensitization in children: the natural history and long-term follow-up. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: 217-223

CREVEL RWR, BALLMER-WBER BK, HOLZHAUSER T, HOURIHANE JOB, KNULST AC, MACKIE AR, TIMMERMANS F, TAYLOR SL. Thresholds for food allergens and their value to different stakeholders. *Allergy* 2008; 63: 597-609

DECHERT U. Gelelektrophoresen. In: Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsunterlagen für das molekularbiologische Labor (Jansohn M, Hrsg). 4. Auflage, Elsevier, GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, 2007.

DERBY CJ, GOWLAND MH, HOURIHANE JO´B. Sesame allergy in Britain: A questionnaire survey of members of the Anaphylaxis Campaign. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16: 171-175

FLEISCHER DM, CONOVER-WALKER MK, CHRISTIE L, BURKS W, WOOD RA. The natural progression of peanut allergy: Resolution and the possibility of recurrence. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 183-189

FRANCO OL, RIGDEN DJ, MELO FR, GROSSI-DE-SÁ MF. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. Structure, function and potential for crop protection. *Eur J Biochem* 2002; 269: 397-412

GRIESS E, MECKELEIN B, SCHULZ K, SERANSKI P, SETZKE E. Isolierung von DNA. In: Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsunterlagen für das molekularbiologische Labor (Jansohn M, Hrsg). 4. Auflage, Elsevier, GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, 2007.

HEFLE SL, BUSH RK, YUNGINGER JW, CHU FS. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantification of selected peanut proteins in foods. *J Food Protection* 1994; 57: 419-423

HIRD H, LLOYD J, GOODIER R, BROWN J, REECE P. Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. *Eur Food Res Technol* 2003; 217: 265-268

HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, MILLS C. Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: new data from the EuroPrevall project. *Anal Bioanal Chem* 2009; 395: 25-35

HOLZHAUSER T, VIETHS S. Indirect competitive ELISA for determination of traces of peanut (*Arachis hypogaea*) protein in complex food matrices. J Agric Food Chem 1999; 47: 601-611

HSIEH KY, TSAI CC, WU CH, LIN RH. Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. Clin Exp Allergy 2003; 33: 1067-1075

HUSAIN FT, BRETbacher IE, NEMES A, CICHNA-MARKL. Development and validation of an indirect competitive enzyme linked-immunosorbent assay for the detection of potentially allergenic sesame (*Sesamum indicum*) in food. J Agri Food Chem 2010; 58: 1434-1441

INVITROGEN. Real-time PCR: from theory to practice, 2008.

JAMES JM, SIXBEY JP, HELM RM, BANNON GA, BURKS W. Wheat α -amylase inhibitor: A second route of allergic sensitization. J Allergy Clin Immunol 1997; 99, 239-244

JANEWAY CA JR, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK MJ. Immunobiology. The Immunsystem in health and disease. 5th edition, Garland Science, New York, Oxford, 2001.

JANKIEWICZ A, BALTES W, BÖGL KW, DEHNE LI, JAMIN A, HOFFMANN A, HAUSTEIN D, VIETHS S. Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. J Sci Food Agric 1997; 75: 359-370

JOHANSSON SGO, HOURIHANE JO'B, BOUSQUET J, BRUIJNZEEL-KOOMEN C, DREBORG S, HAAHTELA T, KOWALSKI ML, MYGIND N, RING J, VAN CAUWENBERGE P, VAN HAGE-HAMSTEN M, WÜTHRICH B. A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. Allergy 2001; 56: 813-824

KIRSCH S, FOURDRILIS S, DOBSON R, SCIPPO ML, MAGHUIN-ROGISTER G, DE PAUW E. Quantitative methods for food allergen: a review. Anal Bioanal Chem 2009; 395: 57-67

KLEBER-JANKE T, CRAMERI R, APPENZELLER U, SCHLAAK M, BECKER WM. Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. Int Arch Allergy Immunol 1999; 119: 265-274

KOPPELMAN SJ, KNOL EF, VLOOSWIJK RAA, WENSING M, KNULST AC, HEFLA SL, GRUPPEN H, PERSMA S. Peanut allergen Ara h 3: Isolation from peanuts and biochemical characterization. Allergy 2003; 58: 1144-1151

KRAUSE S, REESE G, RANDOW S, ZENNARO D, QUARATINO D, PALAZZO P, CIARDIELLO MA, PETERSEN A, BECKER WM. Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. J Allergy Clin Immunol 2009; 124: 771-778

LACK G, FOX D, NORTHSTONE K, GOLDING J. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. N Engl J Med 2003; 348: 977-985

LAUER I, DUERINGER N, POKOJ S; REHM S, ZOCCATELLI G, REESE G, MIGUEL-MONCIN MS, CISTERO-BAHIMA A, ENRIQUE E, LIDHOLM J, VIETHS S, SCHEURER S. The non-specific lipid transfer protein, Ara h 9, is an important allergen in peanut. Clin Exp Allergy 2009; 39: 1427-1437

LEDUC V, MONERET-VAUTRIN DA, TZEN JTC, MORISSET M, GUERIN L, KANNY G. Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. Allergy 2006; 61: 349-356

LOTTSPEICH F, ENGELS JW. Bioanalytik. 2. Auflage, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, München, 2006.

MA Y, GRIESMEIER U, SUSANI M, RADAUER C, BRIZA P, ERLER A, BUBLIN M, ALESSANDRI S, HIMLY M, VÀZQUEZ-CORTÉZ S, REIG RINCON DE ARELLANO I, VASSILOPOULOU E, SAXONI-PAPGEORGIOU P, KNULST AC, FERNANDEZ-RIVAS M, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, BREITENEDER H. Comparison of natural and recombinant forms of the major fish allergen parvalbumin from cod and carp. Mol Nutr Food Res 2008; 52: 196-207

MALEKI SJ, CHUNG SY, CHAMPAGNE ET, RAUFMANN JP. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. J Allergy Clin Immunol 2000b; 106: 763-768

MALEKI SJ, KOPPER RA, SHIN DS, PARK CW, COMPADRE CM, SAMPSON HA, BURKS W, BANNON GA. Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. J Immunol 2000a; 164: 5844-5849

MALEKI SJ, VIQUEZ O, JACKS T, DODO H, CHAMPAGNE ET, CHUNG SY, LANDRY SJ. The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. J Allergy Clin Immunol 2003; 112: 190-195

MARUYAMA N, ICHISE K, KATSUBE T, KISHIMOTO T, KAWASE S, MATSUMURA Y, TAKEUCHI Y, SAWADA T, UTSUMI S. Identification of major wheat allergens by means of the *Escherichia coli* expression system. Eur J Biochem 1998; 255: 739-745

MATISSEK R, STEINER G, FISCHER M. Lebensmittelanalytik. 4.Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2010.

MITTAG D, AKKERDAAS J, BALLMER-WEBER BK, VOGEL L, WENSING M, BECKER WM, KOPPELMAN SJ, KNULST AC, HELBLING A, HEFLE AL, VAN REE R, VIETHS S. Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 1410-1417

MONDOULET L, PATY E, DRUMARE MF, AH-LEUNG S, SCHEINMANN P, WILLEMOT RM; WAL JM, BERNARD H. Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. J Agric Food Chem 2005; 53: 4547-4553

- MUSTORP S, ENGDAHL-AXELSSON C, SVENSSON U, HOLCK A. Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real-time PCR. Eur Food Res Technol 2008; 226: 771-778
- NEWTON C R, GRAHAM A. PCR. 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford, 1994.
- NICHOLL D. Gentechnische Methoden. 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 2002.
- PALOSUO K, ALENIUS H, VARJONEN E, KALKKINEN N, REUNALA T. Rye γ -70 and γ -35 secalins and barley γ -3 hordein cross-react with ω -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. Clin Exp Allergy 2001a; 31: 466-473
- PALOSUO K, VARJONEN E, KEKKI OA, KLEMOLA T, KALKKINEN N, ALENIUS H, REUNALA T. Wheat ω -5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. J Allergy Clin Immunol 2001b; 108: 634-638
- PASTORELLO EA, POMPEI C, PRAVETTONI V, BRENNAN O, FARIOLI L, TRAMBAIOLI C, CONTI A. Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. Allergy 2001a; 67: 45-47
- PASTORELLO EA, VARIN E, FARIOLI L, PRAVETTONI V, ORTOLANI C, TRAMBAIOLI C, FORTUNATO D, GIUFFRIDA MG, RIVOLTA F, ROBINO A, CALAMARI AM, LACAVA L, CONTI A. The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. J Chromatogr B 2001b; 756: 85-93
- POMÉS A, HELM RM, BANNON GA, BURKS W, TSAY A, CHAPMAN MD. Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h 1. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 640-645
- POMS RE, KLEIN CL, ANKLAM E. Methods for allergen analysis in food: a review. Food Additives and Contaminants 2004; 21: 1-31
- PONS L, CHERY C, ROMANO A, NAMOUR F, ARTESANI MC, GUÉANT JL. The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. Allergy 2002; 57: 88-93
- QIAGEN. DNeasy® Blood & Tissue Handbook, 2006.
- RABJOHN P, HELM EM, STANLEY JS, WEST CM, SAMPSON HA, BURKS W, BANNON GA. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. J Clin Invest 1999; 103: 535-542
- RADAUER C, BUBLIN M, WAGNER S, MARI A, BREITENEDER H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. J Allergy Clin Immunol 2008; 121: 847-852

REJEB SB, ABBOTT M, DAVIES D, CLÉROUX C, DELAHAUT P. Multi-allergen screening immunoassay for the detection of protein markers of peanut and four tree nuts in chocolate. *Food Addit Contam* 2005; 22: 709-715

RESTANI P, BERETTA B, FIOCCHI A, BALLABIO C, GALLI CL. Cross-reactivity between mammalian proteins. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89: 11-15

RICHTLINIE 2007/68/EG DER KOMMISSION vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten. *Amtsblatt der Europäischen Union* vom 28. November 2007.

SAMPSON HA. Anaphylaxis and emergency treatment. *Pediatrics* 2003; 111: 1601-1608

SAMPSON HA. Food allergy. Part 2: Diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 981-989

SAMPSON HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:805-819

SCARAVELLI E, BROHÉE M, MARCHELLI R, VAN HENGEL AJ. Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products. *Eur Food Res Technol* 2008; 227: 857-869

SCARAVELLI E, BROHEÉ M, MARCHELLI R, VAN HENGEL AJ. The effect of heat treatment on the detection of peanut allergens as determined by ELISA and real-time PCR. *Anal Bioanal Chem* 2009; 395: 127-137

SCHÖRINGHUMER K, CICHNA-MARKL M. Development of a real-time PCR method to detect potentially allergenic sesame (*Sesamum indicum*) in food. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 10540-10547

SCHÖRINGHUMER K, REDL G, CICHNA-MARKL. Development and validation of a duplex real-time PCR method to simultaneously detect potentially allergenic sesame and hazelnut in food. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 2126-2134

SHEWRY PR, NAPIER JA, TATHAM AS. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell* 1995; 7: 945-956

SICHERER SC. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 881-890

SICHERER SH, SAMPSON HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 470-475

SICHERER SH, TEUBER S. Current approach to the diagnosis and management of adverse reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1146-1150

SPUERGIN P, WALTER M, SCHILTZ E, DEICHMANN K, FORSTER J, MUELLER H. Allergenicity of α -caseins from cow, sheep and goat. *Allergy* 1997; 52: 293-298

STASSEN M. Absorptionsmessungen. In: Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsunterlagen für das molekularbiologische Labor (Jansohn M, Hrsg). 4. Auflage, Elsevier, GmbH Spektrum Akademischer Verlag, München, 2007; 1-3

STEPHAN O, VIETHS S. Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed food. J Agric Food Chem 2004; 52: 3754-3760

TAYLOR SL, HEFLE SL, BINDSLEV-JENSEN C, BOCK SA, BURKS W, CHRISTIE L, HILL DJ, HOST A, HOURIHANE JOB, LACK G, METCALFE DD, MONERET-VAUTRIN DA, VADAS PA, RANCE F, SKRYPEC DJ, TRAUTMAN TA, MALMHEDEN-YAMAN I, ZEIGER RS. Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: How much is too much? J Allergy Clin Immunol 2002; 109: 24-30

TEUBER SS, JARVIS KC, DANDEJAR AM, PETERSON WR, ANSARI AA. Identification and cloning of a complementary DNA encoding a vicilin-like proprotein, Jug r 2, from English walnut kernel (*Juglans regia*), a major food allergen. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 1311-1120

UNTERSMAYR E, BAKOS N, SCHÖLL I, KUNDI M, ROTH-WALTER F, SZALAI K, RIEMER AB, ANKERSMIT HJ, SCHEINER O, BOLTZ-NITULESCU G, JENSEN-JAROLIM E. Anti-ulcer drugs promote IgE formation toward dietary antigens in adult patients. The FASEB Journal 2005a

UNTERSMAYR E, POULSEN LK, PLATZER M, PEDERSEN MH, BOLTZ-NITULESCU G, STAHL SKOV P, JENSEN-JAROLIM E. The effects of gastric digestion on codfish allergenicity. J Allergy Clin Immunol 2005; 115: 377-382

WALLOWITZ ML, CHEN RJY, TZEN JTC, TEUBER SS. Ses i 6, the sesame 11S globulin, can activate basophils and shows cross-reactivity with walnut in vitro. Clin Exp Allergy 2007; 37: 929-938

WATANABE T, AKIYAMA H, MALEKI S, YAMAKAWA H, IJIMA K, YAMAZAKI F, MATSUMOTO T, FUTO S, ARAKAWA F, WATAI M, MAITANI T. A specific qualitative method for peanut (*Arachis hypogaea*) in food using polymerase chain reaction. J Food Biochem 2006; 30: 215-233

WEN HW, BOREJSZA-WYSOCKI W, DE CORY TR, DURST RA. Peanut allergy, peanut allergens, and methods for the detection of peanut contamination in food products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2007; 6: 47-58

WOLFF N, COGAN U, ADMON A, DALAL I, KATZ Y, HODOS N, KARIN N, YANNAI S. Allergy to sesame in human associated primarily with IgE antibody to a 14 kDa 2S albumin precursor. Food and Chemical Toxicology 2003; 41: 1165-1174

WOOD RA. The natural history of food allergy. Pediatrics 2003; 111: 1631-1637

YEUNG JM, COLLINS PG. Enzyme immunoassay for determination of peanut proteins in food products. J AOAC Int 1996; 79: 1411-1416

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Rilling Kristina Elisabeth
geboren am 18.10.1986
in Judenburg
Österreichische Staatsbürgerin
Römisch-Katholisch
ledig

BILDUNG:

ab 03/2011	Masterstudium Lebensmittelwissenschaften und -technologie an der Universität für Bodenkultur Wien
10/2005 – 01/2011	Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien mit dem Schwerpunkt Lebensmittelproduktion und -technologie
09/1997 – 06/2005	BG und BRG Judenburg abgeschlossen mit Matura
09/1992 – 07/1997	Volksschule Judenburg Stadt

PRAXIS:

05/2010 – 06/2010	Praktikum in der Abteilung Lebensmittelchemie an der Universität für Bodenkultur mit dem Schwerpunkt <ul style="list-style-type: none">➤ PCR-Gelelektrophorese➤ Real-time PCR
07/2009	Praktikum bei der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH im Kompetenzzentrum für Rückstandsanalytik in Wien mit dem Schwerpunkt <ul style="list-style-type: none">➤ Rückstandsanalytik von Pestiziden in Futtermittel- und Lebensmittelproben➤ Rückstandsanalytik von Aflatoxinen in diversen Probenmatrizes mittels HPLC